

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



***Cambios funcionales en células
proliferantes de Arabidopsis thaliana
crecidas en ambientes de gravedad alterada***

Ana Isabel Manzano Pérez

Licenciada en Ciencias Biológicas

Madrid, 2011

Departamento de Biología Medioambiental
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

***Cambios funcionales en células proliferantes de
Arabidopsis thaliana crecidas en ambientes de
gravedad alterada***

Ana Isabel Manzano Pérez

Licenciada en Ciencias Biológicas

Madrid, 2011

Bajo la dirección de los doctores:
Francisco Javier Medina Díaz
Raúl Herranz Barranco

Tutora de la Facultad de
Ciencias Biológicas (UCM):
M^a Teresa González Jaén

V^o B^o Directores de tesis doctoral:

V^o B^o Tutora de doctorado:

Dr. Francisco Javier Medina Díaz

M^a Teresa González Jaén

Dr. Raúl Herranz Barranco

Con cariño para mi abuela,

*“siempre estará en mi
corazón”.*

“La duda es la madre del descubrimiento”

(Ambrose Bierce)

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), la posibilidad de haberme permitido la realización de esta tesis doctoral y especialmente al departamento de Biología Medioambiental, por su ayuda y por poner a nuestra disposición la utilización de recursos materiales y de aparatos necesarios.

Agradecer a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, donde he vivido tantos años de mi vida, desde el primer día que entré para estudiar la carrera de Biología hasta el día de lectura de mi tesis doctoral.

Quiero agradecer a mis directores de tesis Dr. Francisco Javier Medina Díaz y Dr. Raúl Herranz Barranco, la oportunidad que me han dado permitiéndome la realización de esta tesis, así como la confianza que han depositado siempre en mí. También me gustaría darles las gracias por toda su ayuda tanto a nivel científico como a nivel personal. La verdad es que ha sido un verdadero placer trabajar a vuestro lado, no sé si volveré a estar tan a gusto en otro sitio.

A mis compañeros de laboratorio Isabel, Antonio, por sus enseñanzas y a Miguel y Khaled, que son el nuevo espíritu del laboratorio. Y por supuesto a Mercedes, por todo lo que me ha enseñado, por su alegría, apoyo y comprensión, *sin ella esta tesis no hubiera sido posible.*

Quiero dar las gracias a todos los miembros del laboratorio de Javier Cañada y Jesús Jiménez, donde estoy trabajando durante unos meses, por su calurosa acogida y su estupendo recibimiento. *Muchas gracias por ponérmelo tan fácil, la química ya la tenía completamente olvidada.*

A Camelia y Oliver, por todo lo que me ayudaron cuando estuve trabajando a su lado, por su hospitalidad y su amistad.

A Mayte, mi compañera de doctorado, *ánimo* ya nos queda menos. Y a María, por su ayuda y alegría.

Quiero dar las gracias a mis amigos del CIB; Fran, Meme, Livia, Gema, Fátima, Alberto, Nacho, Lourdes, Virginia, Margarita, Ana, Irene, Paula, Imma y José, por su ayuda, apoyo y comprensión. Gema, espero que mantengas tu alegría y que en tu nueva etapa todo te vaya muy bien. Meme, Livia y Fátima, gracias por las charlas, las tardes y por haberme ayudado en momentos difíciles, sois geniales. Alberto y Fran, sois únicos, no cambiéis nunca. Os tengo que dar las gracias por tantas cosas, pero especialmente por hacerme sonreír. *Muchas gracias chicos.*

A mis amigas, Marta, Gloria, Rebeca, Mamen y Mari Jose con las que tantas cosas he vivido. Por los buenos momentos que hemos tenido, las risas y como hemos crecido juntas.

A toda mi familia, a mis abuelos, mis tíos por haberme cuidado y educado desde que era tan pequeña. A mi hermana, por su serenidad y su paciencia. *Es la persona con la que mejor me llevo aunque no lo parezca.* Y, cómo no, a mis padres, por su apoyo incondicional, su ayuda, por creer en mí en todo momento y por todo el esfuerzo que les ha costado mis estudios y mi preparación. Os quiero.

Por último, quiero dar las gracias a Carlos, por ser mi gran apoyo durante los últimos ocho años de mi vida, ha sido mi compañero de viaje a lo largo de este tiempo. Por su dedicación, su paciencia, su cariño y su comprensión. Espero que estemos juntos durante mucho tiempo.

Finalmente, quiero agradecer a los diferentes grupos de investigación que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral:

- Al Dr. Julio Sáez-Vásquez (CNRS-Universidad de Perpignan, Francia), que nos suministró los anticuerpos anti-AtNUC-L1.
- A la Dra. Eugénie Carnero-Díaz (Universidad Pierre et Marie Curie, Paris VI, Francia), que nos suministró las construcciones *CYCB1::uidA* y *DR5::uidA*.
- Al Dr. Jack van Loon (Universidad Libre de Amsterdam, Holanda), que nos facilitó la utilización de la *Random Positioning Machine* y por su gran ayuda en el manejo del aparato.
- A nuestros colaboradores de Nottingham (Universidad de Nottingham, UK), por permitirnos la utilización del *Levitador magnético*, y ayudarnos en el manejo del aparato y por facilitarnos los materiales necesarios.
- Al Dr. Peter Christianen (Universidad de Nijmegen, Holanda), por facilitarnos la utilización del *Levitador magnético* y por su ayuda en el manejo del aparato.
- Al servicio de genómica y proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), por su colaboración en la realización de técnicas de alta complicación, imprescindibles para esta tesis.
- A los servicios de microscopía electrónica, microscopía confocal, citometría de flujo, proteómica y genómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) por su ayuda en la realización de técnicas fundamentales para los experimentos que comprenden esta tesis.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la financiación de Ministerio de Ciencia e Innovación (Plan Nacional de I+D+i), mediante los proyectos: **Experimentos biológicos en microgravedad real y simulada en el marco del programa ELIPS-2 de la Agencia Espacial Europea. Estudios en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* AYAESP2006-13600-C02-02 y Alteraciones Funcionales en Plantas Causadas por la Microgravedad. Investigaciones en el Espacio y en Tierra en el marco de Proyectos Multilaterales Europeos AYA2009-07952** y una ayuda del **programa FPI**. También debemos agradecer a la Agencia Espacial Europea su financiación de la preparación de experimentos espaciales, mediante el proyecto: **Systematic Evaluation of the ground based (micro-) gravity simulation paradigms available in Europe. First Phase: Similarities and Differences between the different approaches. SEGMGSP_E_Ph1.**

RESUMEN

La gravedad es un componente constante del medio ambiente en la Tierra que condiciona numerosas funciones de los seres vivos. El crecimiento y el desarrollo de las plantas son funciones vitales que se fundamentan en procesos celulares como la proliferación y el crecimiento celular que ocurren en los tejidos meristemáticos, donde la "competencia meristemática" consiste en el estricto acoplamiento entre el estado proliferativo de las células y su capacidad de crecimiento. En estudios previos, realizados en la Estación Espacial Internacional (ISS) y en un simulador de microgravedad en Tierra, nuestro grupo ha mostrado que la ausencia de gravedad es capaz de desacoplar el crecimiento y la proliferación celular en el meristemo de la raíz.

Para consolidar, extender y ampliar estos estudios previos hemos utilizado un nuevo dispositivo simulador de la gravedad alterada basado en el fenómeno físico de la levitación magnética y hemos abordado por primera vez los efectos de la hipergravedad sobre estos procesos biológicos, tanto en el Levitador magnético como en la Centrífuga de Gran Diámetro (LDC). Los estudios sobre la tasa de proliferación celular, la ultraestructura nucleolar y los niveles de proteínas nucleolares, realizados sobre muestras en microgravedad ($0g^*$), confirmaron el desacople entre la proliferación y el crecimiento celular. La expresión de la ciclina B1, gen marcador de la transición G2/M del ciclo celular, evaluada mediante la tinción GUS en plantas transgénicas, disminuyó en $0g^*$ a pesar del aumento en la tasa de división celular. En cuanto a la hipergravedad, las moderadas alteraciones detectadas en estas condiciones en cualquiera de los dos dispositivos utilizados indican que produce un estrés menos intenso para las plantas que la microgravedad. Por otra parte, la influencia de un campo magnético de alta intensidad alteró por sí sola el crecimiento y desarrollo de la planta, pudiendo enmascarar los efectos de la alteración de la gravedad detectados en el Levitador.

En condiciones de microgravedad simulada, y también por efecto de un campo magnético elevado, se observó la inhibición del transporte polar de auxinas según el patrón de tinción GUS de la raíz de plántulas transgénicas en las que puede visualizarse la expresión de un gen inducible por estas hormonas. La consecuencia fue la acumulación de auxinas en la punta de la raíz, que podría ser responsable de la mayor proliferación celular en el meristemo radicular en estas condiciones. Sin embargo, la hipergravedad no alteró el transporte polar de auxinas.

Con objeto de comprobar si existe respuesta a la alteración de la gravedad por parte de células no especializadas en su percepción, y también para permitir la realización de técnicas

moleculares que demandan más biomasa, hemos utilizado cultivos celulares sólidos como un material celular homogéneo en proliferación. Los cambios detectados en la expresión génica y en el patrón de proteínas a nivel de genoma completo (estudios basados en microarrays y en geles bidimensionales de proteínas) o de genes (PCRq) y proteínas específicas (*Western-blot*), así como los parámetros ultraestructurales del nucleolo en los cultivos, revelan alteraciones del crecimiento y la proliferación celular comparables a las encontradas en plántulas, indicando que al menos una parte significativa de la respuesta a la gravedad alterada es independiente de las células especializadas que contienen mecanorreceptores. En los cultivos celulares se verificó la alteración de las proporciones de las distintas fases del ciclo celular (y probablemente de la duración del ciclo), el cambio en la expresión de numerosos genes reguladores que intervienen en los puntos de chequeo (*checkpoints*) de las transiciones entre fases, y también la desregulación de la biogénesis de los ribosomas, mediante la alteración de la estructura nucleolar y los cambios transcripcionales y post-traduccionales en proteínas claves del proceso, como nucleolina y fibrilarina.

La intensidad de las alteraciones debidas al estrés gravitatorio pudo suavizarse mejorando las condiciones de cultivo al aumentar el aporte de energía; por el contrario, la sinergia entre la gravedad alterada y el alto campo magnético incrementó el estrés ambiental y la intensidad de las alteraciones.

Un aporte adicional de este trabajo ha sido la generación de plantas transgénicas en las que una señal fluorescente (gen reportero *GFP*) se expresa bajo el control del promotor del gen de la ciclina B1 o de la nucleolina L1, dos proteínas de interés en la regulación de la proliferación y el crecimiento celular. Estas plantas posibilitarán el seguimiento de la expresión de estos genes en tiempo real, sin necesidad de fijación y mejorarán la eficacia y el rendimiento de futuros experimentos espaciales o en Tierra.

La alteración de la gravedad produce una respuesta de estrés atípica, diferente de otras respuestas a estrés abiótico. Ciertamente, una alteración gravitatoria es una novedad para las plantas, que a lo largo de su evolución han debido afrontar diferentes cambios en condiciones ambientales, pero nunca en la intensidad del vector gravedad. Esta causa puede dar cuenta de la especificidad de la respuesta al estrés gravitatorio.

ABSTRACT

Gravity, a constant component of the terrestrial environment, affects numerous functions of living beings. Plant growth and development are vital functions which are founded on cellular processes such as cell proliferation and growth that occur in meristematic tissues, where "meristematic competence" consists of the strict coupling between the proliferative state of the cell and its growing capability. In previous studies, carried out in the International Space Station (ISS) and in a microgravity simulator on ground, our group has shown that the absence of gravity is capable of decoupling cell growth and proliferation in the root meristem.

In order to consolidate and extend these previous studies, we have used a new device for simulation of altered gravity, based on the physical phenomenon of magnetic levitation and we have approached for the first time the effects of hypergravity on these biological processes, using both the Magnetic Levitator and the Large Diameter Centrifuge (LDC). Studies on the cell proliferation rate, nucleolar ultrastructure and the levels of nucleolar proteins, performed on samples grown under microgravity ($0g^*$), confirmed the decoupling of cell proliferation and cell growth. Expression of the cyclin B1 gene, a marker of the G2/M transition in the cell cycle, evaluated by GUS staining on transgenic plants, decreased in $0g^*$ despite the increase of the cell proliferation rate. Regarding hypergravity, moderate alterations recorded in these conditions in the two devices utilized indicate that the stress produced is weaker than under microgravity. Otherwise, since the sole influence of a high magnetic field was capable of altering plant growth and development, the effects of altered gravity detected in the Magnetic Levitator could have been somewhat masked by the magnetic field effects.

In conditions of simulated microgravity, as well as under the influence of a high magnetic field, inhibition of the auxin polar transport was observed, according to the GUS staining pattern of the root of transgenic seedlings in which it was possible to visualize the expression of an auxin responsive gene. As a consequence, auxin was accumulated in the root tip and this could explain the higher proliferation rate in root meristematic cells in these conditions. However, hypergravity did not alter the auxin polar transport.

With the purpose of testing whether cells not specialized in gravity perception respond to gravity alteration or not, and also for allowing the use of molecular techniques highly demanding in terms of biomass, we have used solid *in vitro* cell cultures, as a homogeneous proliferating cellular material. Changes detected either in gene expression and in the protein pattern at the level of the whole genome (studies based on microarrays and in bi-dimensional protein gels), or in specific genes (qPCR) and proteins (Western blot), as well as the ultrastructural parameters of the nucleolus of cultured cells, reveal alterations in cell growth and proliferation which can be compared to those found in seedlings, indicating that at least a significant part of the response to altered gravity does not depend on specialized cells containing mechanoreceptors. On cell cultures we verified the alteration of the relative proportion of cell cycle phases (and probably also of the duration of the cycle), the change in expression of numerous genes acting as regulators in cell cycle checkpoints of phase transitions, and the deregulation of ribosome biogenesis by means of the alteration of nucleolar structure and of transcriptional and post-translational changes of key proteins of this process, such as nucleolin and fibrillarin.

The intensity of alterations caused by the gravitational stress could be weakened by improving the seedling culture conditions with an increase of the energy supply (sugars), and it was strengthened by an amplified environmental stress caused by the synergy between the altered gravity and the high magnetic field.

An additional contribution of this work has been the generation of transgenic plants in which a fluorescent signal (*GFP* reporter gene) is expressed under the control of either the cyclin B1 or the Nucleolin L1 gene promoter. Both of these are proteins of interest in the regulation of cell growth and proliferation. These plants will made possible to follow gene expression in real time, without the need of fixation, and will improve the efficiency and the yield of future space and ground-based experiments.

Gravity alteration produces an atypical response, different from other plant responses to abiotic stress. Certainly, the gravity alteration is novel for plants, which throughout evolution, have had to face against different environmental changes, but never against the strength of the gravity vector. This could be the reason for the specificity of response to the gravitational stress.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	1
NOTA DE NOMENCLATURA	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Modelo de Crecimiento y Proliferación Celular en Microgravedad	6
1.1. Motivación de la Investigación Espacial	6
1.2. El Gravitropismo como Respuesta Especializada a la Gravedad	7
1.3 La estrecha relación entre el Crecimiento y la Proliferación Celular en Células Proliferantes	9
1.3.1. El cilindro cortical del meristemo radicular	9
1.3.2. Los cultivos celulares <i>in vitro</i>	12
2. Procesos y Mecanismos Biológicos asociados a la Proliferación y el Crecimiento Celular y el papel de las Fitohormonas en su regulación	13
2.1 El Ciclo Celular	13
2.1.1 Control de la proliferación celular	14
2.1.2. Mecanismos de regulación en las transiciones G1/S y G2/M en condiciones favorables y en situaciones de estrés	17
2.2. El Nucleolo y la Estructura Nucleolar	20
2.2.1 Proteínas nucleolares	24
2.3. Hormonas de crecimiento	28
2.3.1. Las auxinas	28
2.3.2. Respuesta hormonal al estrés biótico y abiótico	32
3. Problemática de la Investigación Biológica en Microgravedad	33
3.1. Simuladores Inerciales de Gravedad Alterada en Tierra	34
3.2. Simuladores basados en el Principio de Levitación Magnética	35
4. Antecedentes: El Efecto de la Microgravedad sobre el Crecimiento y el Desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	37
OBJETIVOS	41

MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Material biológico	46
1.1. Líneas de plantas y construcciones genéticas utilizadas	46
1.2. Crecimiento de la especie vegetal <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo “Columbia” (Col 0), manipulación y obtención de semillas	47
1.3. Cultivo celular <i>in vitro</i> en suspensión procedente de la especie vegetal <i>Arabidopsis thaliana</i> , ecotipo “Landsberg erecta” (MM2d)	47
1.4. Cultivos <i>in vitro</i> de callos vegetales procedentes del cultivo celular MM2d	47
2. Anticuerpos, plásmidos y oligonucleótidos	48
2.1. Anticuerpos	48
2.2. Plásmidos	49
2.3. Diseño de oligonucleótidos, cebadores o “primers”	52
3. Instrumentación	53
3.1. Levitador magnético localizado en la Universidad de Nottingham (Oxford Instruments, Abingdon, UK)	53
3.2. Levitador magnético localizado en la Universidad Radbound de Nijmegen (poly-bitter magnet, High Magnetic Field Laboratory (HFML), Nijmegen, Holanda)	54
3.3. Random Positioning Machine (RPM), ESA-ESTEC (Holanda)	55
3.4. Centrifuga (LDC) ESA- ESTEC (Holanda)	56
4. Técnicas de microscopía óptica	57
4.1. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (Gus) en líneas transformadas	57
5. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión	58
5.1. Preparación de las muestras	58
5.2. Microscopía óptica sobre cortes, tallado y ultramicrotomía	59
5.3. Inmunocitoquímica para microscopía electrónica	59
5.4. Tinción para microscopía electrónica	59
6. Citometría de flujo	60
7. Técnicas de genómica	61
7.1. Extracción de RNA	61
7.2. Extracción de DNA	61
7.3. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) preparativa	62
7.4. Análisis de expresión génica utilizando “microarrays” de transcriptoma completo	63
7.5. Análisis de expresión génica por Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)	64

8. Técnicas de proteómica	66
8.1. Extracción de proteínas	66
8.2. Precipitación y cuantificación de proteínas	66
8.3. Identificación de cambios proteómicos por DiGE (Electroforesis Bidimensional Diferencial Fluorescente) y análisis de péptidos mediante espectrofotometría de masas	67
8.4. Electroforesis 2D para Western-blot	68
8.5. Inmunodetección de proteínas por 2D-Western-blot	69
9. Análisis estadístico	70
10. Generación de plantas transgénicas CYCB1:GFP y AtNUC-L1:GFP	70
10.1. Ligación en pGEM- T easy	72
10.2. Transformación de células competentes <i>E. coli</i>	72
10.3. Selección de colonias positivas de <i>E. coli</i>	73
10.4. Digestión con enzimas de restricción específicas	74
10.5. Ligación de las secuencias promotoras con el plásmido binario	74
10.6. Transformación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
10.7. Selección de colonias positivas de <i>A. tumefaciens</i>	76
10.8. Transformación de <i>A. thaliana</i> mediante infiltración con <i>A. tumefaciens</i>	76
10.9. Selección de plantas transgénicas homocigotas	77
11. Diseño de experimentos realizados en diferentes instalaciones GBF (Ground Based Facilities; Instalaciones de Simulación de Microgravedad en Tierra) Europeas	77
11.1. Experimentos en el levitador magnético (Nottingham, Reino Unido)	77
11.1.1. Diseño experimental con la línea transgénica <i>CYCB1:uidA</i>	77
11.1.2. Diseño experimental con la línea transgénica <i>CYCB1:uidA</i> crecida con mayor concentración de sacarosa en el medio de cultivo	78
11.1.3. Diseño experimental con la línea transgénica <i>DR5:uidA</i>	79
11.2. Experimentos en la Centrifuga de Gran Diámetro (LDC) (Noordwijk, Holanda)	80
11.2.1. Diseño experimental con la línea transgénica <i>CYCB1:uidA</i> y la línea silvestre	80
11.3. Experimento en la RPM (“Random Positioning Machine”) y en la Centrifuga (LDC) (Noordwijk, Holanda)	81
11.3.1. Diseño experimental con la línea transgénica <i>DR5:uidA</i>	81
11.4. Experimento en los simuladores: RPM, centrifuga (LDC) y levitador magnético (Nijmegen) con callos vegetales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81

RESULTADOS	83
<i>PRIMERA PARTE</i>	
<i>Estudio sistemático del estado proliferativo y el crecimiento celular de células meristemáticas de plántulas de Arabidopsis thaliana expuestas a diferentes simuladores de gravedad alterada</i>	
1. Estudios de proliferación y crecimiento celular con la línea transgénica CYCB1:uidA sometida a diferentes condiciones gravitatorias en el levitador magnético (Nottingham, UK) en medio de cultivo estándar	84
1.1. Posición de las plántulas en los tubos	86
1.2. Longitud de las plántulas	88
1.3. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (GUS)	90
1.4. Estudios morfométricos del meristemo radicular sometido a campos magnéticos	92
1.4.1. Anchura del meristemo de la raíz	93
1.4.2. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm)	94
1.4.3. Tamaño nucleolar (μm^2)	94
1.5. Estudios ultraestructurales e inmunocitoquímicos de cuantificación de nucleolina	97
2. Estudio de la línea transgénica CYCB1:uidA, en la Centrifuga de Gran Diámetro (LDC) (Holanda, ESA-ESTEC)	101
2.1. Longitud de las plántulas	101
2.2. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (GUS)	103
2.3. Estudios morfométricos del meristemo radicular	105
2.3.1. Anchura del meristemo de la raíz	105
2.3.2. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm)	105
2.3.3. Tamaño nucleolar (μm^2)	105
2.4. Estudios ultraestructurales en el nucleolo	107
2.5. Resumen de las variaciones en la proliferación celular y el crecimiento celular observados en hipergravedad	108
3. Estudios de proliferación y crecimiento celular con la línea CYCB1:uidA sometida a diferentes condiciones gravitatorias en el levitador magnético (UK) en un medio de cultivo suplementado con una mayor cantidad de sacarosa	110
4. Estudio sistemático de la distribución de auxinas con la línea transgénica DR5:uidA en todos los simuladores de gravedad alterada utilizados	114
4.1. Patrón de distribución de auxinas en el extremo de la raíz en condiciones de gravedad alterada	115
4.2. Cuantificación de la distribución de auxinas en el extremo de la raíz, en condiciones de gravedad alterada	117

SEGUNDA PARTE***Estrategias para el estudio a nivel molecular de la proliferación y el crecimiento celular con plántulas completas en gravedad alterada***

5. Estudios genéticos a nivel de plántula entera en el levitador magnético (Nottingham, UK)	120
5.1. Resultados de PCRq	120
5.1.1. Expresión de <i>AtNUCL1</i>	120
5.1.2. Expresión de <i>CYCB1;1</i>	121
6. Obtención de plantas transgénicas con las construcciones <i>CYCB1:GFP</i> y <i>AtNUC-L1:GFP</i>	124
6.1. Construcción <i>CYCB1:GFP</i>	124
6.2. Construcción <i>AtNUC-L1:GFP</i>	126
6.3. Selección de las plantas transgénicas	127
6.3.1. Evaluación de la expresión de GFP en ambas construcciones por microscopía confocal	127

TERCERA PARTE***Estudio a nivel molecular de la proliferación y el desarrollo celular en gravedad alterada con cultivos celulares sólidos in vitro (callos) de Arabidopsis thaliana***

7. Estudios sobre el nucleolo y el ciclo celular con cultivos celulares sólidos in vitro (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada	132
7.1. Estudios morfométricos y ultraestructurales del nucleolo	134
7.1.1. Tamaño nucleolar	134
7.1.2. Estudios estructurales a microscopía óptica y electrónica	135
7.2. Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo	141
8. Estudios genómicos con cultivos celulares sólidos in vitro (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada	143
8.1. Estudios de expresión génica utilizando “microarrays” de transcriptoma completo	143
8.1.1. Estudios de cambios de expresión génica y análisis ontológicos en genes desregulados en gravedad alterada	143
8.1.2. Comparación de genes desregulados entre las distintas condiciones de gravedad alterada	148
8.2. Estado transcripcional global en condiciones de gravedad alterada	152

8.3. Validación de la expresión de genes de crecimiento/proliferación celular mediante la técnica de qPCR	155
8.3.1. Análisis de la expresión de genes alterados en los microarrays	155
8.3.2. Validación de la expresión de genes de proliferación y crecimiento celular por qPCR	158
8.3.3. Comparación de los resultados obtenidos por microarrays y qPCR	162
9. Estudios proteómicos con cultivos celulares sólidos <i>in vitro</i> (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada	164
9.1. Expresión diferencial de proteínas sometidas a diferente gravedad efectiva en geles bidimensionales (DIGE)	164
9.1.1. Alteraciones comunes a nivel proteico en las muestras sometidas al campo magnético al compararse con ambos controles	167
9.1.2. Selección de proteínas para su identificación por secuenciación	170
9.2. Análisis de cuantificación y estado de la proteína At-Nucl1 mediante la técnica de Western-blotting	174
 DISCUSION	 179
 1. Cambios inducidos por la Gravedad Alterada en los procesos de Proliferación y Crecimiento Celular	 180
1.1. Efecto comparado de la microgravedad simulada sobre el crecimiento y la proliferación celular en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en distintos simuladores	180
1.2. Comparación entre plántulas crecidas en condiciones de hipergravedad en dos simuladores basados en diferentes fuerzas físicas	182
1.3. Comparación de resultados obtenidos en meristemos radiculares y los encontrados en cultivos celulares sólidos de <i>Arabidopsis</i> , sometidos a diferentes simuladores de gravedad alterada	185
1.4. Efectos sinérgicos asociados a las condiciones de cultivo	189
1.4.1. Efectos del campo magnético sobre el crecimiento de las plántulas	189
1.4.2. Comparación entre plántulas sometidas a levitación magnética a diferente concentración de sacarosa	190
 2. Efectos globales de la Gravedad Alterada a Nivel Molecular	 192
2.1. Comparación de los efectos globales detectados a nivel genómico y proteómico	192
2.1.1. Efecto de la gravedad alterada a nivel transcriptómico en cultivos celulares sólidos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	192
2.1.2. Efecto de la gravedad alterada sobre el perfil proteómico en cultivos celulares sólidos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	196
2.2. Efectos sinérgicos de la modificación simultánea del campo gravitatorio y el campo magnético	199

3. Alteraciones del Ciclo Celular y de su Regulación Hormonal inducidas por las condiciones de Gravedad Alterada	200
3.1. Variaciones en la expresión de los genes que controlan el Ciclo Celular	200
3.1.1. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en muestras sometidas a hipergravedad en la Centrifuga de Gran Diámetro (LDC)	201
3.1.2. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en muestras sometidas a microgravedad simulada en la Random Positioning Machine (RPM)	205
3.1.3. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en muestras sometidas a distintas condiciones de gravedad alterada en el Levitador magnético	207
3.2. Variación de la expresión génica de genes claves de fitohormonas implicadas en la división y en el crecimiento celular	212
3.2.1. Alteraciones en genes implicados en la vía de respuesta a ácido abscísico (ABA) y su influencia en la división y el crecimiento celular	213
3.2.2. Alteraciones en genes implicados en la vía de respuesta a brasinoesteroides, giberelinas, ácido jasmónico y etileno y su influencia en la división y el crecimiento celular	214
3.2.3. Alteraciones en genes implicados en la vía de respuesta a auxinas y su influencia en la división y el crecimiento celular	214
3.3. Modelo integrado del efecto de la gravedad alterada en proliferación y crecimiento celular	219
4. Nuevas herramientas y perspectivas para futuros experimentos en Microgravedad Real en la Estación Espacial Internacional	224
CONCLUSIONES	227
BIBLIOGRAFIA	231

CLAVE DE ABREVIATURAS

(no se incluyen las abreviaturas de genes ni de proteínas)

ABA	Ácido abscísico
ARFs	Elementos de respuesta a auxinas
Aux/IAA	Ácido-auxina/ Indol-3-ácido acético.
BSA	Seroalbúmina bovina
CAK	Quinasa activadora de CDKs
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CFD	Componente Fibrilar Denso del nucleolo
CFs	Centros Fibrilares del nucleolo
CG	Componente Granular del nucleolo
CKI	Proteína inhibidora de CDKs
CYC	Ciclina
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESA	Agencia Espacial Europea
GAR	Región rica en glicina y arginina
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>“Green Fluorescent protein”</i>)
GUS	β -glucuronidasa
IAA	Indol-3-ácido acético.
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopironósido
ISS	Estación Espacial Internacional
kDa	Kilodalton
LC	Medio Luria-Bertoni para el crecimiento de microorganismos

LDC	Centrífuga de gran diámetro.
NOR	Región del Organizador Nucleolar
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PFA	Paraformaldehído
pGEM- T- easy	Sistema vector de clonación
pI	Punto isoelectrico
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoruro
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol	RNA polimerasa
RPM	<i>Random Positioning Machine</i> (Dispositivo de microgravedad simulada)
RRM	Dominio de reconocimiento del RNA
rRNA	RNA ribosómico
RT-PCRq	Retrotranscripción seguida de Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Sodio-dodecil-sulfato)
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopirósido

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

Durante la realización del presente trabajo se han seguido las directrices propuestas por Meinke y Koornneef (1997) para *Arabidopsis thaliana* respecto a la denominación de genes, proteínas, líneas transformadas y mutantes. De forma continua, podemos encontrar actualizaciones de esta normativa en la dirección de Internet <http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/guidelines.jsp>

Las reglas más importantes que se han seguido son las siguientes:

- Genes: En general, se designan con tres letras mayúsculas (a veces más) escritas en cursiva. Ejemplo: *NUC*. Los genes homólogos de diferentes especies se diferencian anteponiendo un prefijo específico, por ejemplo, *At* (*Arabidopsis thaliana*). Este prefijo no se pone en cursiva; por ejemplo *AtNUC*. Diferentes variantes de un gen en una especie se indican con números o con una letra y un número. Ejemplo: *AtNUC-L1*.
- La proteína codificada por el gen se indica mediante la misma abreviatura con letras mayúsculas y en tipografía normal. Ejemplo: *NUC*, *AtNUC*, *AtNUC-L1*. Además, pueden emplearse nombres propios por los que la proteína es comúnmente conocida (ejemplo: nucleolina). En estos casos se emplea tipografía normal y puede o no ponerse en mayúsculas la primera letra.
- Un mutante en un determinado gen se designa con el nombre del gen en minúsculas y en cursiva. Ejemplo: *nuc*, *Atnuc*, *Atnucl1*.
- Las construcciones génicas que conllevan fusiones de dos genes (incluyendo la fusión entre el promotor de un gen y la región codificante de otro) y las líneas transformadas con estas construcciones se nombran con los dos genes separados por dos puntos (también se acepta la separación por un guión). Ejemplo: *AtNUC:GFP*. La separación por dos puntos dobles debe reservarse para las inserciones.

INTRODUCCIÓN

- 1. Modelo de Crecimiento y Proliferación Celular en Microgravedad**
- 2. Procesos y Mecanismos Biológicos asociados a la Proliferación y el Crecimiento Celular y el papel de las Fitohormonas en su regulación**
- 3. Problemática de la Investigación Biológica en Microgravedad**
- 4. Antecedentes: El Efecto de la Microgravedad sobre el Crecimiento y el Desarrollo de *Arabidopsis***

INTRODUCCION

1. Modelo de Crecimiento y Proliferación Celular en Microgravedad

1.1. Motivación de la Investigación Espacial

El crecimiento y el desarrollo de los organismos vegetales son procesos fisiológicos que están altamente condicionados por las condiciones ambientales en las que tienen lugar. Puesto que las plantas son una fuente de alimentación esencial para el sustento animal en general y de la especie humana en particular, es necesario estudiar estos procesos fisiológicos para optimizar el rendimiento de la producción agrícola.

La gravedad es un factor ambiental que ha permanecido constante sobre la superficie de la Tierra a lo largo de toda la evolución biológica, hasta nuestros días y que condiciona parámetros fundamentales del desarrollo y del crecimiento de las plantas. Las plantas vasculares terrestres con las que convivimos hoy en día son el resultado de unos 400 millones de años de evolución en presencia de gravedad. Sólo la exploración espacial, es decir, la salida del campo de influencia del planeta Tierra, ha permitido, por primera vez en el curso de la evolución, confrontar a los seres vivos, entre ellos el ser humano y los organismos vegetales, con un medio ambiente en el que la gravedad no está presente o está fuertemente alterada respecto a la existente en la Tierra. Esto es un hecho trascendental por muchas razones, algunas de ellas de estricto interés científico teórico y otras surgidas de la necesidad de continuar la exploración en dirección a planetas cercanos a la Tierra, lo que conllevará la realización de vuelos espaciales de muy larga duración. Nadie discute esta necesidad, que cuenta con un fuerte apoyo en la opinión pública, aunque los plazos para su ejecución sean más o menos largos dependiendo de los avances tecnológicos y de los recursos disponibles.

Así pues, entender mejor cómo funciona el crecimiento y el desarrollo de las plantas en condiciones de microgravedad a nivel celular y molecular, servirá para estar preparados ante las necesidades que surgirán en la futura implementación de la agricultura espacial y de los denominados “Sistemas de Soporte Vital” que deberán acompañar necesariamente al ser humano en sus viajes interplanetarios, pero también

puede ser útil para optimizar las técnicas de cultivo en nuestro propio planeta, haciéndolas más sostenibles. Sería interesante recordar que la investigación espacial es una de las fuentes más importantes de innovación científica y tecnológica con repercusiones sobre la calidad de vida del ser humano en la Tierra. Por otra parte, el estudio de este proceso en células vegetales nos puede dar información muy valiosa sobre las posibles consecuencias que podrían tener estas condiciones ambientales sobre los propios humanos, puesto que procesos celulares esenciales, como la proliferación, el ciclo celular, la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas están altamente conservados en todas las células eucarióticas (Myers, 1954; Wheeler, 2010).

1.2. El Gravitropismo como respuesta especializada a la Gravedad

Una consecuencia del hecho de que las plantas hayan vivido siempre y hayan evolucionado bajo la acción del campo gravitatorio en la Tierra, es que han adquirido la habilidad de usar la gravedad como un parámetro importante para su vida (Ishii *et al.*, 1996). Muchos estudios han demostrado que cuando se someten las plantas en crecimiento a unas condiciones de gravedad diferentes a $1g$ (gravedad terrestre: $9,8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$) se producen alteraciones en el crecimiento y en el desarrollo y también se producen rápidos cambios en la expresión génica (Centis-Aubay *et al.*, 2003; Kimbrough *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2006; Vashisth y Nagarajan, 2008; Perbal, 2001).

El vector gravedad es clave para definir la orientación de las plantas, ya que éstas han desarrollado órganos específicos que perciben el campo gravitatorio. El sitio de percepción de la gravedad se encuentra localizado en la punta de la raíz, en las células de la columela o estatocitos. Estas células poseen amiloplastos (estatolitos), agregados de material de alta densidad (almidón), que se mueven influenciados por el vector gravedad (Perbal, 1971; Sievers y Volkmann, 1979). En condiciones de gravedad terrestre normal, $1g$, los estatocitos aparecen polarizados, con los estatolitos en su zona basal (según el vector gravedad) y el núcleo en la parte apical, en contacto con la membrana plasmática (Figura 1). Al producirse un cambio en la intensidad o en la dirección del vector gravedad (por ejemplo, cuando se cambia la orientación de la planta de la posición vertical a una posición horizontal), los estatocitos se desplazan de su

ubicación polarizada y el núcleo se separa de la membrana plasmática. El movimiento de los estatolitos provoca tensiones en los filamentos de actina, que activan los canales de calcio dependientes de calmodulina, los cuales alteran la distribución y el gradiente de auxinas en la raíz. Estas hormonas están implicadas en funciones de división, elongación y diferenciación celular, con lo cual la consecuencia de la alteración en la posición del vector gravedad es una elongación diferencial de ciertas zonas de la raíz que provoca la curvatura de la raíz necesaria para recuperar la dirección de crecimiento paralela al vector gravedad (Perbal, 2001; Young *et al.*, 1990). Por otra parte, experimentos llevados a cabo por Fitzelle y Kiss (2001), demostraron que al someter plantas mutantes de *Arabidopsis* deficientes en amiloplastos a hipergravedad, con una aceleración de 5g, se recupera el gravitropismo perdido a 1g.

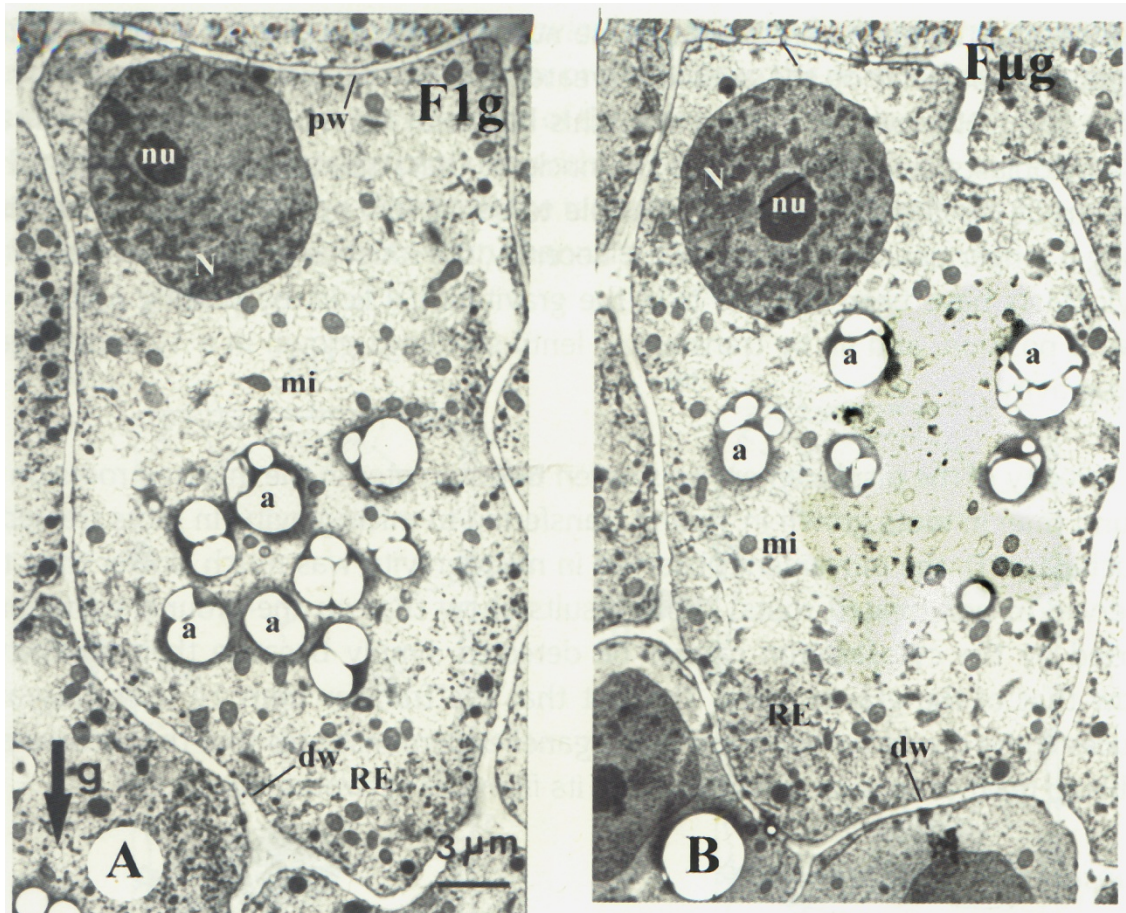


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica en la que se visualizó por primera vez a nivel ultraestructural la polarización de los estatocitos de la columela de la raíz de lenteja en condiciones de gravedad control (A) y la desorganización de su distribución en condiciones de microgravedad (B). Tomadas de Perbal et al. (1987).

1.3. La estrecha relación entre el Crecimiento y la Proliferación Celular en Células Proliferantes

Estudios llevados a cabo en el siglo XIX demostraron que la diferencia de tamaño en un mismo órgano entre distintas especies de plantas se debe al número de células y no al tamaño celular. Por consiguiente, un órgano grande no contiene células mayores sino un mayor número de células con un tamaño conservado (Niklas, 1994). La capacidad que tienen algunas células de dividirse respondiendo a señales de crecimiento y sin diferenciarse se denomina “competencia meristemática” (Esau, 1977). Según el modelo de “control del tamaño celular para el desarrollo de los órganos en las plantas” diseñado por Mizukami (2001), la división celular está íntimamente coordinada con el crecimiento celular (síntesis de proteínas, biogénesis de ribosomas, etc). Además de estar estrechamente coordinados, estos parámetros (la división celular y el número de células producidas en el meristemo) son esenciales para el desarrollo y la organización de la planta, ya que responden a promotores de crecimiento que afectan a la planta completa (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Cuando estos promotores de crecimiento se activan, actúan coordinando y provocando el crecimiento y la división celular en el órgano de la planta, pero cuando éstos se reprimen por pérdida de la competencia meristemática, se inhiben ambos procesos, provocándose la diferenciación celular (Figura 2).

1.3.1. El cilindro cortical del meristemo radicular

La masa celular del meristemo radicular de *Arabidopsis thaliana* consta de tres capas de células localizadas en el cilindro cortical: epidermis, córtex y endodermis (Figura 3; Scheres *et al.*, 2002). Experimentos de incorporación de bromo-desoxiuridina como marcador de la replicación de DNA llevados a cabo por Fujie *et al.* (1993), utilizando células del meristemo de la raíz demostraron que en las células del cilindro central (la estela) se incorporaba tan sólo un 28% de precursor, a diferencia del cilindro cortical donde se detectó una incorporación del 84%. Por lo tanto, sólo las células del cilindro cortical presentan la tasa de división y proliferación celular típica de las células meristemáticas. En plántulas de cuatro días a partir de la activación de la germinación,

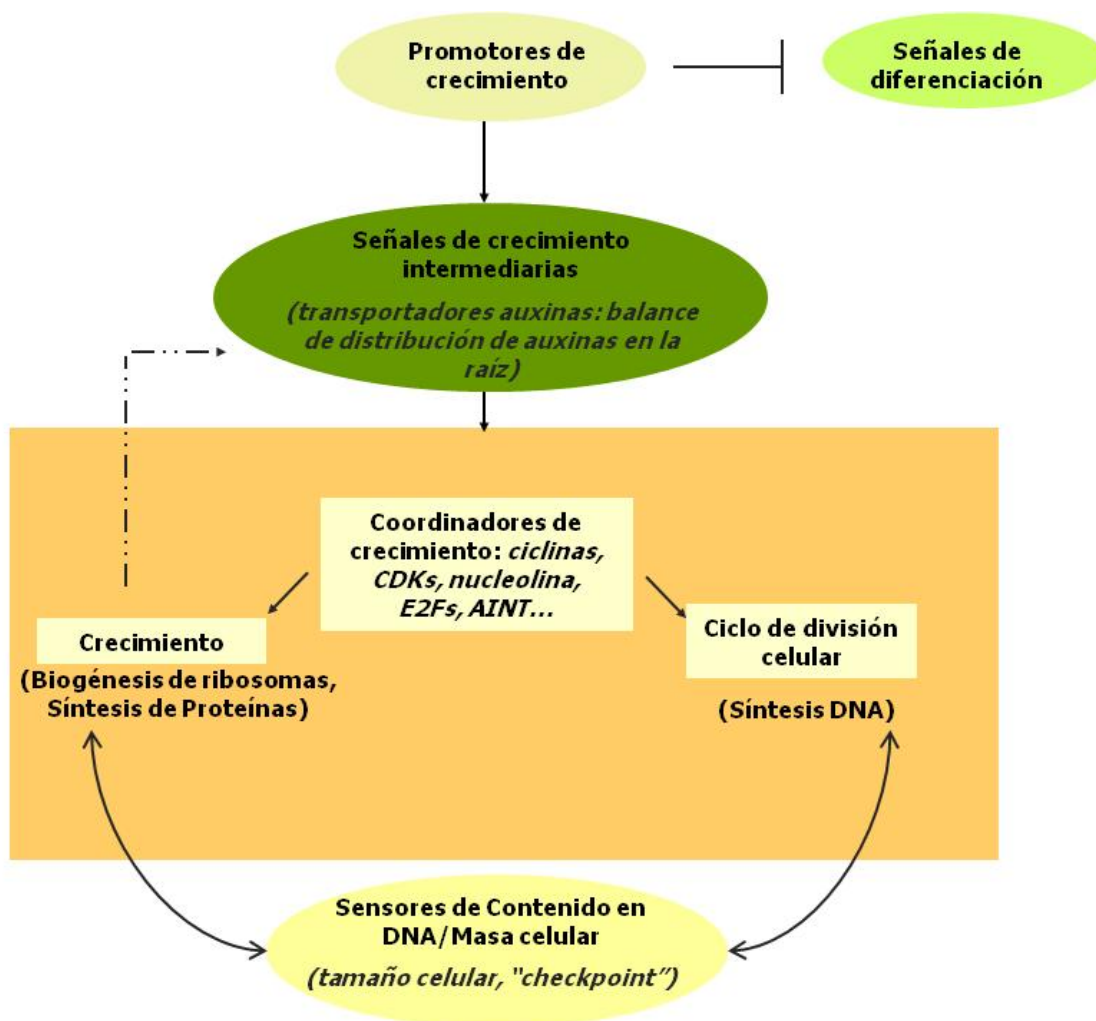
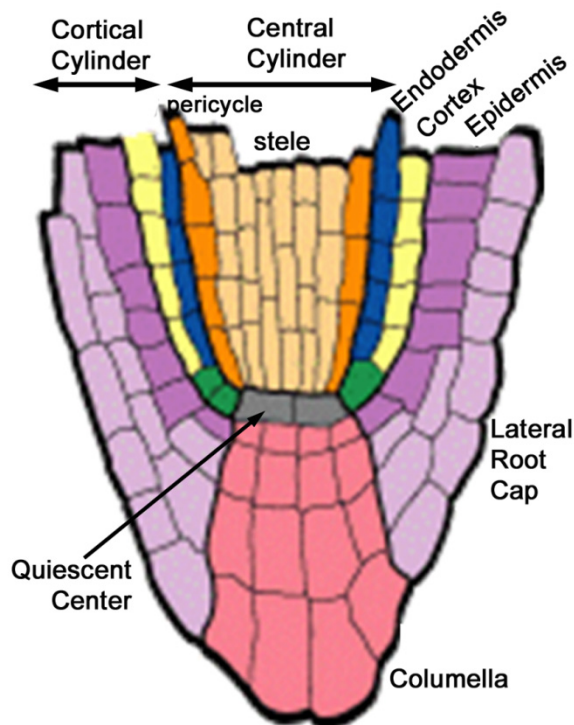


Figura 2. Esquema de relación entre crecimiento celular (síntesis de proteínas, biogénesis de ribosomas) y proliferación celular (ciclo celular, replicación del DNA, división celular) en condiciones fisiológicas de competencia meristemática. Ambos procesos están regulados por las mismas señales o estímulos a nivel de órgano. Adaptado de Medina y Herranz (2010).

el pico de división celular se localiza 600 μm por encima del extremo de la raíz, por lo que se puede considerar que un fragmento entre 300 y 700 μm a partir de la punta de la raíz contiene la mayor proporción de células meristemáticas en este modelo biológico (Beemster y Baskin, 1998). Realmente, la extensión de este fragmento de meristemo que contiene las células más activamente proliferantes es variable, siendo más largo en plántulas con más días de vida. Además, se ha demostrado experimentalmente que el crecimiento de la raíz se debe más al incremento en el número de células que a la elongación de éstas (Beemster y Baskin, 1998; Scheres *et al.*, 2002).



From Scheres *et al.* (2002)

Figura 3. Sección longitudinal de la raíz de *Arabidopsis* que muestra los diferentes tipos celulares. Las células meristemáticas se localizan principalmente en las capas de la endodermis (azul), cortez (amarilla) y epidermis (morado oscuro). Los estatolitos se localizan en las células de la columela (rosa).

1.3.2. Cultivos celulares *in vitro*

Los cultivos *in vitro* de células vegetales en suspensión se pueden considerar equivalentes a células meristemáticas e indiferenciadas dado que se pueden mantener en un estado de proliferación activo permanente (Menges y Murray, 2002; Figura 4). De este modo, el cultivo celular es una fuente de tanta cantidad de células proliferantes como se desee para realizar estudios utilizando técnicas demandantes en términos de biomasa, como las genómicas y proteómicas. También permite estudiar la maquinaria básica del ciclo celular, debido a que los reguladores principales del ciclo celular y genes relacionados son similares en diferentes sistemas celulares en división. Esto se pone de manifiesto por la ausencia de fuertes diferencias de expresión génica entre los cultivos celulares y los tejidos proliferantes de plantas completas. En general, los reguladores del ciclo celular no son dependientes del tipo de tejido, con algunas excepciones, como los genes *4CKL*, que no forman parte de las proteínas esenciales de la regulación del ciclo (Menges *et al.*, 2003; 2005).

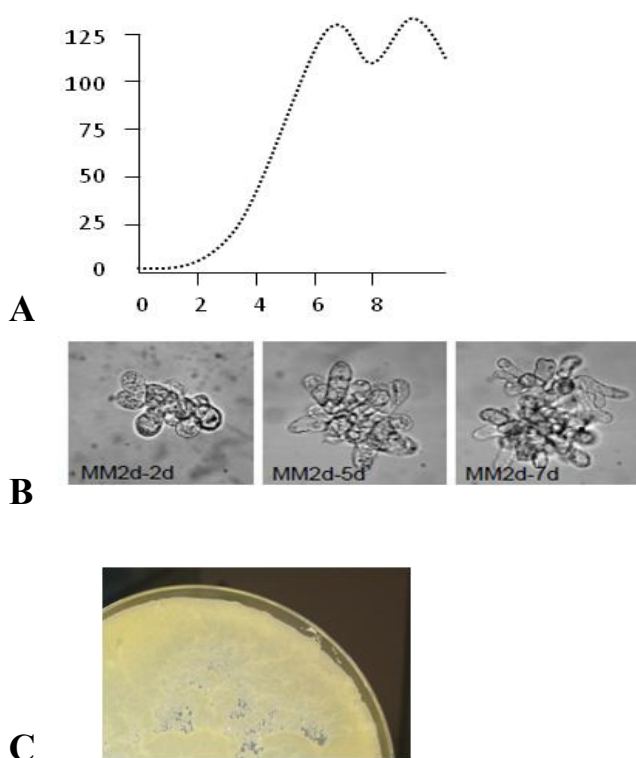


Figura 4. Modelo de cultivo celular en suspensión de *Arabidopsis thaliana* (MM2d). A) Curva de crecimiento del cultivo MM2d en oscuridad (se recomienda el pase del cultivo cada 7 días). B) Aspecto de las células del cultivo en diferentes momentos de su crecimiento. Adaptado de Menges y Murray (2002). C) Aspecto de un callo formado a partir de cultivos MM2d en ausencia y presencia de luz.

2. Procesos y Mecanismos Biológicos asociados a la Proliferación y el Crecimiento Celular y el papel de las Fitohormonas en su regulación

2.1. El Ciclo Celular

El ciclo celular es un proceso ordenado y repetitivo en el tiempo que controla en qué momento las células crecen y se dividen dando lugar a dos células hijas. Este ciclo consta de cuatro etapas sucesivas, G1, S, G2 y M (Figura 5). Durante la fase G1 (*gap*) se lleva a cabo el crecimiento celular gracias a la síntesis de proteínas y de RNA, y se produce y se acumula energía en forma de ATP. La fase de síntesis (S) es por definición en la que se replica el contenido del DNA. La fase G2 (*gap*), es otra fase de crecimiento celular que se diferencia de G1 por poseer el doble de la dotación genética habitual y por estar comprometida en la preparación de la célula para la división celular, incluidas las modificaciones y cambios en el citoesqueleto necesarios. Finalmente, durante la fase M ocurre la mitosis, y por lo tanto, la división celular que da lugar a dos células hijas. El ciclo celular es un proceso muy complejo regulado por múltiples factores, donde están implicadas una gran cantidad de proteínas que actúan mediante un mecanismo de transducción de señales, que incluye ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas, proteína del retinoblastoma, factores de transcripción de la familia E2F, etc. Por otra parte, se ha observado una clara influencia hormonal en la regulación del ciclo celular, en la que actúan auxinas, citoquininas, brasinoesteroides, etc. También es bien conocida la importancia de contar con una adecuada fuente de carbono y una suficiente tasa de fotosíntesis (Inze y De Veylder, 2006), aunque este último factor no es esencial, ya que el ciclo celular ocurre también en plantas etioladas.

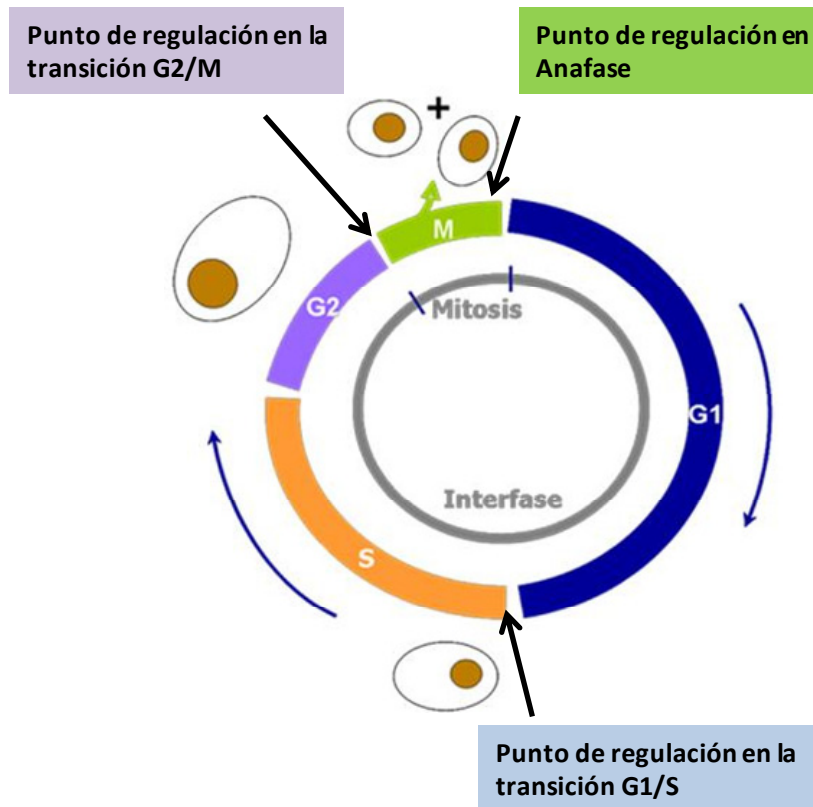


Figura 5. Representación esquemática de las cuatro fases del ciclo celular: G1, S, G2 y M, con sus puntos de regulación (*checkpoints*) correspondientes.

2.1.1 Control de la proliferación celular

El ciclo celular está altamente regulado y los principales puntos de regulación se encuentran en las transiciones G1/S y G2/M, existiendo otro punto de regulación en la mitosis entre la metafase y la anafase (Inze y De Veylder, 2006). La regulación del ciclo celular se debe principalmente a la actividad de los complejos formados por las proteínas denominadas ciclinas y otras que se unen específicamente a ellas, las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), de modo que la principal función de las ciclinas es controlar la actividad de las CDKs.

Las ciclinas presentan una secuencia de unos 100 aminoácidos, donde se encuentra la "caja de destrucción" para su catálisis, la cual es susceptible de ubiquitinización y de una rápida destrucción proteolítica (De Veylder *et al.*, 1997). Se han identificado hasta 49 ciclinas en *Arabidopsis*, divididas en 8 clases (A, B, C, D, H, L, P y T) y 23 subgrupos (Torres Acosta *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Estos números son varias veces más altos que los descritos para animales y levaduras (Inzé y De Veylder, 2006). Hay tres ciclinas (o clases de ciclinas) de mayor importancia en el ciclo

celular: la ciclina A, que aparece al comenzar la fase S, y actúa principalmente durante esta fase de síntesis, la ciclina B, que controla la transición de la fase G2 a mitosis, y la ciclina D que es importante en ambas transiciones G1/ S y G2/M (Kono *et al.*, 2003; Koroleva *et al.*, 2004; Nakagami *et al.*, 2002; Van Leene *et al.*, 2010). A diferencia de las otras dos ciclinas, la presencia de la ciclina tipo D depende de señales extracelulares, que a su vez estimulan y mantienen la progresión del ciclo celular (Renaudin *et al.*, 1996).

Las CDKs son proteínas altamente conservadas en eucariotas, siendo la CDKA la primera quinasa descubierta en *Arabidopsis* (Ferreira *et al.*, 1991). En plantas existen seis clases de quinasas dependientes de ciclinas que se nombran de la A a la G. Las quinasas tipo A, B, D y F están ligadas a la regulación del ciclo celular (Umeda *et al.*, 2005). La estructura de la quinasa CDK se caracteriza por tener una hendidura catalítica con sitios de unión a ATP y al sustrato, y un sitio más estable y flexible de unión a ciclinas (Joubes *et al.*, 2000; Figura 6). Las dos quinasas que forman parte de la maquinaria principal de control del ciclo son la CDKA, que cuenta con el motivo PSTAIRE de unión a ciclinas, muy conservado en la evolución, y la CDKB, exclusivas de plantas, con más de un motivo conocido PPTA/TLRE (Magyar *et al.*, 1997). Actualmente algunos experimentos parecen revelar que la actividad y función de ambas CDKs no son iguales, al igual que su estructura, atribuyéndole a la CDKB una posible nueva actividad en la regulación del ciclo celular en la fase G2/M (Andersen *et al.*, 2008; Boudolf *et al.*, 2006). Además, se ha encontrado un nuevo grupo de genes llamados *CDK-LIKE* (1-15), que poseen un mecanismo de activación y modulación muy similar al de las CDKs aunque no comparten el mismo dominio promotor (Joubes *et al.*, 2000; Menges *et al.*, 2005).

La actividad de las CDKs se regula por sus niveles de síntesis (regulación transcripcional) y de catálisis y también por interacción con otras proteínas. La activación de la CDK se produce por un cambio conformacional que le permite la unión al sustrato tras la fosforilación de la treonina 160 (Figura 6). Este proceso está mediado por quinasas activadoras de CDKs (CAKs). Existen dos tipos de CAKs en *Arabidopsis*, una CAK dimérica relacionada con la CDK7 de humanos que se une a la ciclina H, que es la CDKD1;3 y otra CAK monomérica que es la CDKF (Umeda *et al.*, 1998;

Vandepoele *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* la regulación negativa por fosforilación de residuos sobre los complejos CDKs-ciclinas se lleva a cabo por los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (KRPs/ICKs; Figura 6). Existe además la quinasa Wee1 (Umeda *et al.*, 1998), proteína descrita en animales y en levaduras, de la que se ha demostrado su actividad de fosforilación inhibitoria de la CDKA en la transición de G2/M. Aunque se ha identificado la proteína WEE1 en plantas, no está clara su implicación en la regulación del ciclo celular en plantas del mismo modo que sus presuntos homólogos de animales y levaduras, debido a que también se ha detectado expresión de *WEE1* en condiciones favorables de crecimiento (Dissmeyer *et al.*, 2009; Malladi y Johnson, 2011). Por otra parte se ha demostrado que la subunidad CKS se une a las CDKs, teniendo un importante papel en la interacción de la CDK con reguladores positivos o negativos en la regulación del ciclo celular (Bourne *et al.*, 1996). La CDK activa es capaz de llevar a cabo varias funciones imprescindibles para la división celular y, en general, para la actividad proliferativa de la célula, tales como fosforilar la histona 1 en los cromosomas mitóticos, fosforilar componentes del citoesqueleto y del retinoblastoma (Rb), así como puede mediar la destrucción de componentes celulares utilizados en etapas anteriores por la vía de la ubiquitina (King *et al.*, 1996).

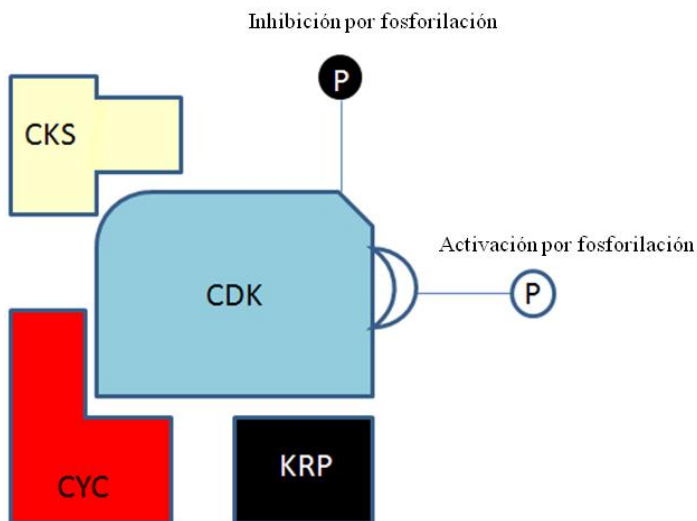


Figura 6. Esquema de la regulación de CDKs. Posee dos sitios susceptibles de fosforilación donde actúan las proteínas activadoras (CAK) o represoras (por ejemplo, Wee1). Posee un sitio de reconocimiento para los inhibidores KRP, para la proteína adaptadora CKS y para las ciclinas.

2.1.2. Mecanismos de regulación en las transiciones G1/S y G2/M en condiciones favorables y en situaciones de estrés

El hecho más destacado en la regulación de la transición G1/S en condiciones favorables de crecimiento, en presencia de factores que estimulan la división celular como son auxinas, azúcares, citoquininas, etc., es la inducción de la síntesis de ciclinas tipo D, y su unión a la proteína CDK correspondiente. Este complejo es inactivo y necesita ser activado por CAKs, permitiéndose así la expresión de factores de transcripción (E2F), necesarios para la fase de síntesis (replicación del DNA). Este mecanismo se lleva a cabo gracias a la destrucción de la proteína inhibidora de retinoblastoma (Rb), mediada por la activación de CDKs (Figura 7). En cambio, en condiciones desfavorables de crecimiento causantes de situaciones de estrés, como por ejemplo el frío, se activan las proteínas KRP ó ICKs, inactivando el complejo CDK-ciclina, e impidiendo la progresión del ciclo celular (Inze y De Veylder, 2006).

La transición G2/M también está regulada por la activación/inactivación del complejo CDK-ciclina. El mecanismo de acción y de regulación por las proteínas activadoras e inhibidoras es igual al anterior. Sin embargo en este punto parecen tener importancia en la regulación dos proteínas adicionales, WEE1 (mencionada anteriormente) y CDC25, presumibles homólogas de las proteínas del mismo nombre de animales y levaduras, bien caracterizadas en cuanto a su estructura y función en estos grupos taxonómicos (Ferreira *et al.*, 1991; Inze y De Veylder, 2006; Francis, 2007). El gen de la quinasa WEE1 se activa transcripcionalmente en respuesta a daños en el DNA o ante situaciones de estrés con consecuencias en la replicación fosforilando la CDKA en el denominado *P-loop* (Thr-14 y Tyr-15), y otras CDKs (Shimotohno *et al.*, 2006), y bloqueando la progresión del ciclo celular en fase G2, hasta que se complete la replicación o se repare el daño en el DNA. La proteína CDC25 es capaz de desfosforilar los residuos fosforilados por WEE1, permitiendo la entrada en mitosis (Figura 7).

Sin embargo, la regulación de CDKs por las proteínas WEE1 y CDC25 (mecanismo de fosforilación/ desfosforilación de la treonina 14 y tirosina 15) no está clara en *Arabidopsis*. Se ha encontrado una proteína homóloga a CDC25, la cual ha perdido el dominio regulador N-terminal y no es capaz de complementar mutantes *cdc25* de levaduras; sin embargo es capaz de activar la CDK de *Arabidopsis in vitro*

(Landrieu *et al.*, 2004). Experimentos llevados a cabo por Dissmeyer *et al.* (2009), demostraron que la actividad CDKA, promovida por la fosforilación en el *T-loop* (Thr-161), era similar y comparable a la encontrada en animales y levaduras, pero la regulación por fosforilación/desfosforilación del *P-loop*, donde están implicadas las proteínas WEE1 y CDC25, no es relevante en plantas para el mantenimiento de la función CDKA-ciclina. Esto indicaría la no implicación directa de estas proteínas en la regulación del ciclo celular, una característica que sería exclusiva de plantas. Líneas mutantes para estos dos genes (*wee1* y *cdc25*) mediante el mecanismo de inserción por T-DNA, dieron resultados similares, en cuanto a la no implicación de estas dos proteínas en el mecanismo de regulación en la transición G2/M del ciclo celular (Boudolf *et al.*, 2006). La falta de regulación por estas dos proteínas podría ser sustituida por la CDKB (Andersen *et al.*, 2008). En líneas celulares BY-2 de tabaco se ha visto que la sobreexpresión de CDKB2 puede estimular la entrada en mitosis, indicando que la regulación transcripcional de ciclinas mitóticas podrían modular en parte la transición G2/M (Weingartner *et al.*, 2003). En la misma línea se ha detectado que la CDKB1 reprime la salida del ciclo celular y la endoreduplicación (o, lo que es lo mismo, estimula la división celular) mediante la fosforilación de la proteína ICK2/KRP2; en estado desfosforilado, ICK2/KRP2 es capaz de inhibir la actividad de CDKA, pero la fosforilación de esta proteína por CDKB1 la marca para su destrucción (Figura 7; Boudolf *et al.*, 2006). Así pues, sería la inhibición/desinhibición de CDKA mediante ICK2/KRP2, y no la fosforilación/desfosforilación por WEE1/CDC25, el factor clave de la regulación de la entrada en mitosis en plantas (Boudolf *et al.*, 2006; Dissmeyer *et al.*, 2009).

Recientemente (Francis, 2011) ha postulado una interpretación de la regulación de la transición G2/M que trata de conciliar los resultados previos, aparentemente divergentes. Este autor destaca el hallazgo de la sobreexpresión de *WEE1* y del incremento de la actividad quinasa de WEE1 en condiciones de estrés inducido que afectan a la replicación del DNA, las cuales resultan en la parada del ciclo antes de la entrada en mitosis por la no superación del *checkpoint* de integridad del DNA (De Schutter *et al.*, 2007; Lentz-Gronlund *et al.*, 2009). En lo relativo a CDC25, el mutante *knockout cdc25* es hipersensible a la hidroxiaurea, un inhibidor de replicación, indicando que la fosfatasa CDC25 está efectivamente implicada en el *checkpoint* de integridad de

DNA previo a la mitosis (Spadafora et al., 2011). La propuesta de Francis (2011) es que las interpretaciones aparentemente contradictorias son compatibles, porque las plantas poseen mecanismos redundantes de regulación de la transición G2/M (Figura 7), como respuesta a la multiplicidad de situaciones de estrés ambiental que las plantas deben afrontar en la naturaleza, que exigen un rigor extremo en la seguridad de la superación de los diferentes *checkpoints*.

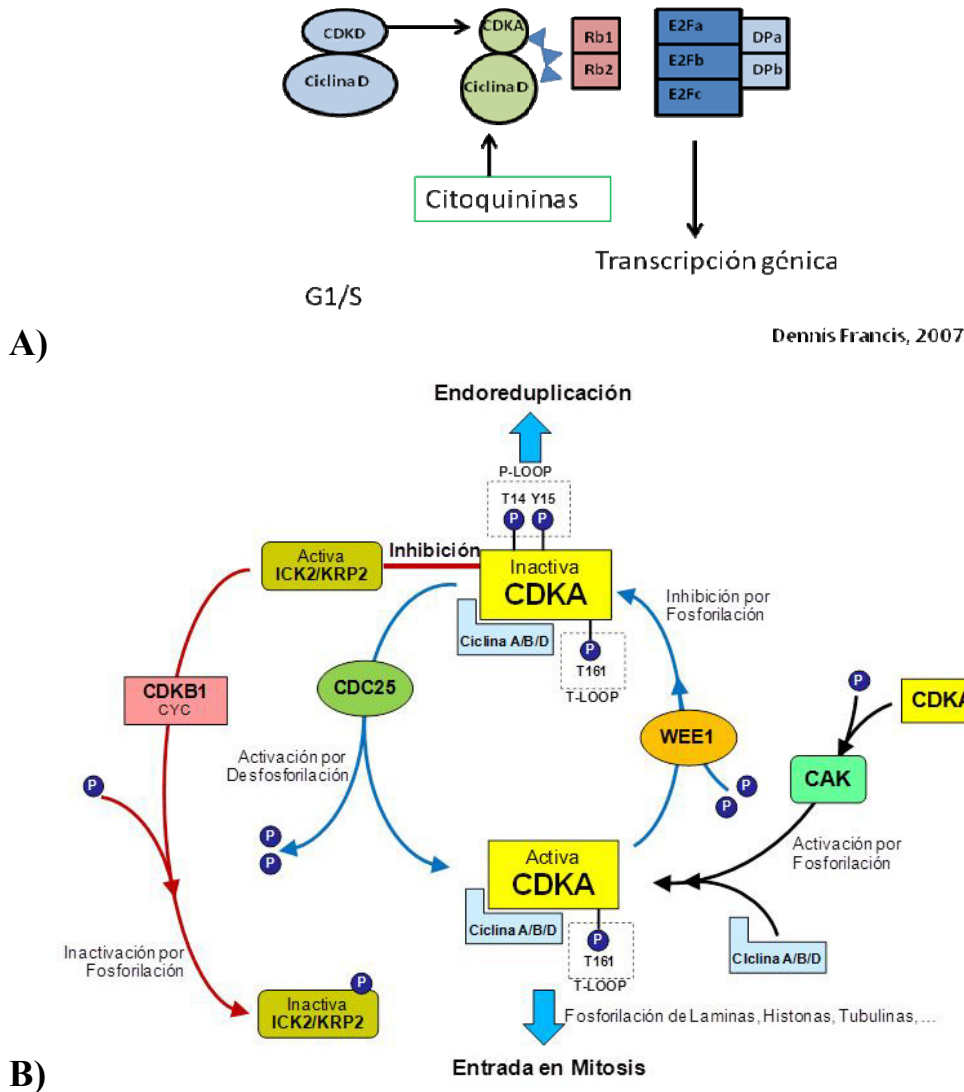


Figura 7. Representación gráfica de la regulación del ciclo en las transiciones G1/S (A) y G2/M (B). A) En condiciones favorables de crecimiento la CDKD se une al complejo CDK-ciclina activando la progresión del ciclo, mediante la destrucción de la proteína del retinoblastoma (Rb) y permitiendo la transcripción génica. B) La fase de transición G2/M está regulada por la activación/inactivación del complejo CDKA-ciclina, donde existen varias teorías de regulación, una idéntica a la de animales basada en la regulación complejo CDK-CDC25-WEE1 (flechas en azul) ó mediante la actividad de la CDKB (flechas en rojo). Ambas son compatibles.

2.2. El Nucleolo y la Estructura Nucleolar

La proliferación y el crecimiento celular son dependientes del aporte continuo de proteínas, como principal requerimiento para poder desempeñar las distintas funciones celulares y para alcanzar el tamaño crítico que permite la división de la célula. Los ribosomas, localizados en el retículo endoplásmico rugoso del citoplasma, son las estructuras donde se sintetizan las proteínas, de modo que la tasa de producción de ribosomas está directamente correlacionada con la regulación de la proliferación y del crecimiento celular (Baserga, 1984; Hannan y Rothblum, 1995).

El nucleolo es un orgánulo nuclear en el cual se producen todas las fases de la biogénesis de ribosomas, con excepción de la síntesis del rRNA 5S y del ensamblaje final de las subunidades del ribosoma. El nucleolo se origina cuando se expresa el gen que codifica para el pre-rRNA, es decir, el RNA precursor de los RNAs ribosómicos (rRNAs). Esta secuencia se encuentra repetida de cientos a miles de veces, según las especies, de modo que todas las copias, organizadas en tándem se agrupan en un segmento del genoma denominado “organizador nucleolar” (NOR), que ocupa una posición definida en uno o varios cromosomas, dependiendo de la especie, la cual se visualiza fácilmente en las preparaciones microscópicas de cromosomas como la "constricción secundaria" (Figura 8).

Estructuralmente el nucleolo cuenta con unos componentes básicos comunes para todos los tipos celulares, cuya organización depende del propio tipo celular, de la actividad celular y de la etapa del ciclo celular donde se encuentre (Medina *et al.*, 2000; Sáez-Vásquez y Medina, 2008).

La organización de los subcomponentes nucleolares, sigue un patrón vectorial de dentro afuera asociado a las etapas sucesivas de la síntesis de ribosomas. En el área central del nucleolo se encuentran los centros fibrilares (CFs), que realmente son sitios de acumulación de rDNA y donde se ensambla el complejo de transcripción, y por consiguiente donde comienza el proceso de biogénesis de los ribosomas. La transcripción del precursor del RNA ribosómico (pre-rRNA) ocurre en la transición entre los CFs y el componente fibrilar denso (CFD) que los rodea (Medina *et al.*, 2000); este CFD es en sí mismo un componente ribonucleoproteico que se corresponde con los

estadios tempranos y medios del procesamiento del pre-rRNA. Por último, más hacia la periferia, se encuentra el componente granular (CG), donde ocurren las etapas tardías del procesamiento del pre-rRNA y el ensamblaje final de cada una de las subunidades del ribosoma, que posteriormente son exportadas al citoplasma para formar los ribosomas maduros. Este módulo estructural puede aparecer repetido un número variable de veces en cada nucleolo, dependiendo de la actividad nucleolar (Figuras 9 y 10; Cerdido y Medina, 1995; Raska, 1995).

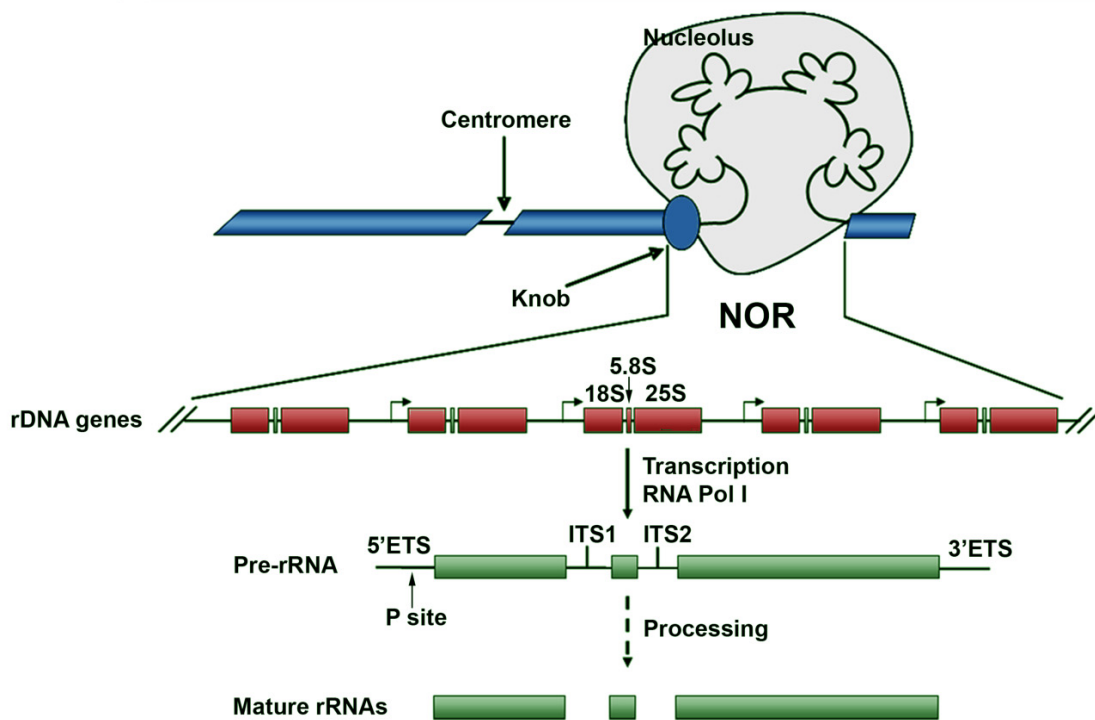


Figura 8. Representación esquemática del Organizador Nucleolar (NOR) como un segmento de un cromosoma concreto. Una parte del NOR se estructura como un botón (knob) de cromatina condensada, mientras que el resto forma un lazo extendido de DNA que contiene múltiples copias de los genes del rRNA, alrededor del cual se organiza el nucleolo. El lazo de DNA se organiza a su vez como acumulaciones focales de rDNA que son los centros fibrilares. Cada unidad génica del rDNA se transcribe por la RNA pol I como un RNA precursor (pre-rRNA) que contiene las secuencias de los rRNAs separadas por espaciadores transcritos externos (ETS) e internos (ITS). El procesamiento del pre-RNA consiste en la eliminación de estos espaciadores y la liberación de los rRNAs que se ensamblan con proteínas ribosómicas. Figura tomada de Sáez-Vásquez y Medina (2008).

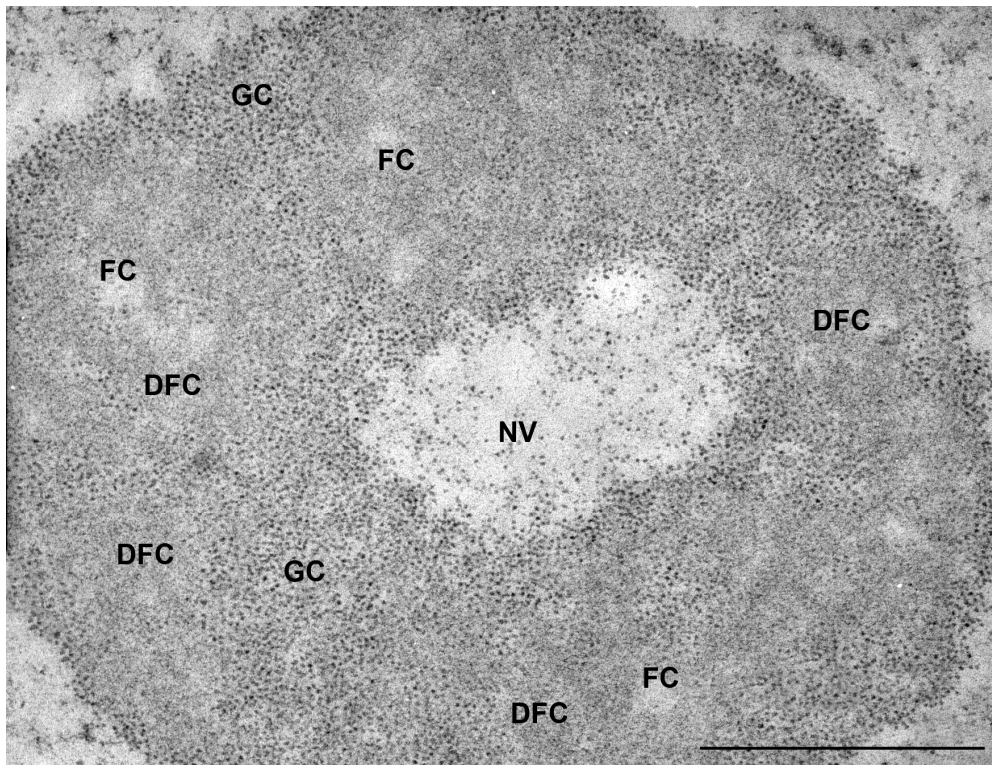
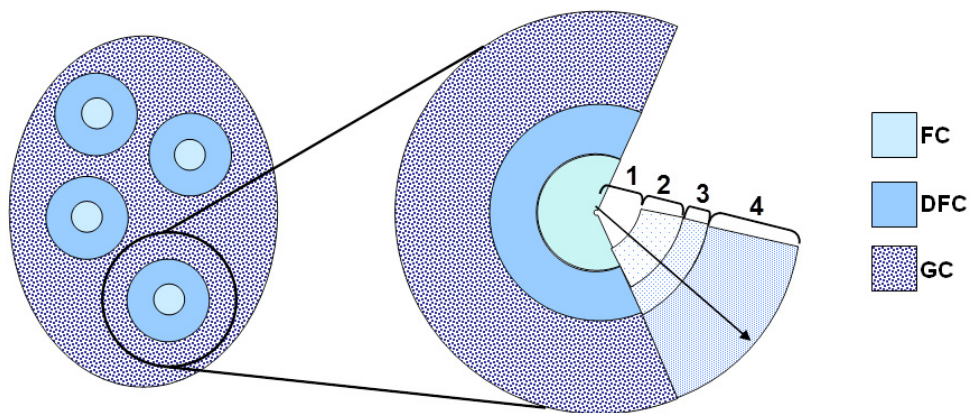


Figura 9. Nucleolo de una célula meristemática de la raíz de *Arabidopsis thaliana* observado al microscopio electrónico de transmisión. Los subcomponentes ultraestructurales aparecen bien definidos: centros fibrilares (FC), componente fibrilar denso (DFC), componente granular (GC) y "vacuola" nucleolar (NV). La barra representa 1 µm. Imagen tomada de Pontvianne et al. (2007).



1. Ensamblaje del Complejo de Transcripción. No Transcripción
2. Transcripción del pre-rRNA
3. Procesamiento del pre-rRNA
4. Procesamiento del pre-rRNA y ensamblaje de los pre-ribosomas

Figura 10. Esquema que representa la estructura y la organización funcional del nucleolo. Estructuralmente, cada Centro Fibrilar (FC) está rodeado de Componente Fibrilar Denso (DFC), el cual a su vez está contenido en el Componente Granular (GC). Las cuatro zonas numeradas 1 a 4 representan las zonas funcionales de esta organización vectorial. Esquema adaptado de De Cárcer y Medina (1999).

La morfología, la estructura y la actividad del nucleolo se modifican dependiendo de la etapa del ciclo celular, tal como fue descrito en cebolla por (González-Camacho y Medina, 2006; Figura 11). Durante la fase G1 se observa un nucleolo pequeño, con escasos CFs y abundante CFD y con actividad moderada. En cambio, en fase G2 aparecen múltiples y pequeños CFs y abundante CG, acompañado de un aumento de tamaño asociado a una mayor actividad nucleolar, e incluso puede aparecer un gran espacio claro central, que contiene partículas prerribosómicas, denominado "vacuola nucleolar" (Figuras 9 y 11; González-Camacho y Medina, 2006; Sáez-Vásquez y Medina, 2008). Durante la transición G2/M, el nucleolo se desensambla progresivamente hasta desaparecer, cesando las actividades de transcripción y procesamiento, aunque los complejos macromoleculares que lo conforman no se desagregan, sino que sólo se inactivan (Medina *et al.*, 1995; Sáez-Vásquez y Medina, 2008; Scheer y Rose, 1984; Roussel *et al.*, 1994).

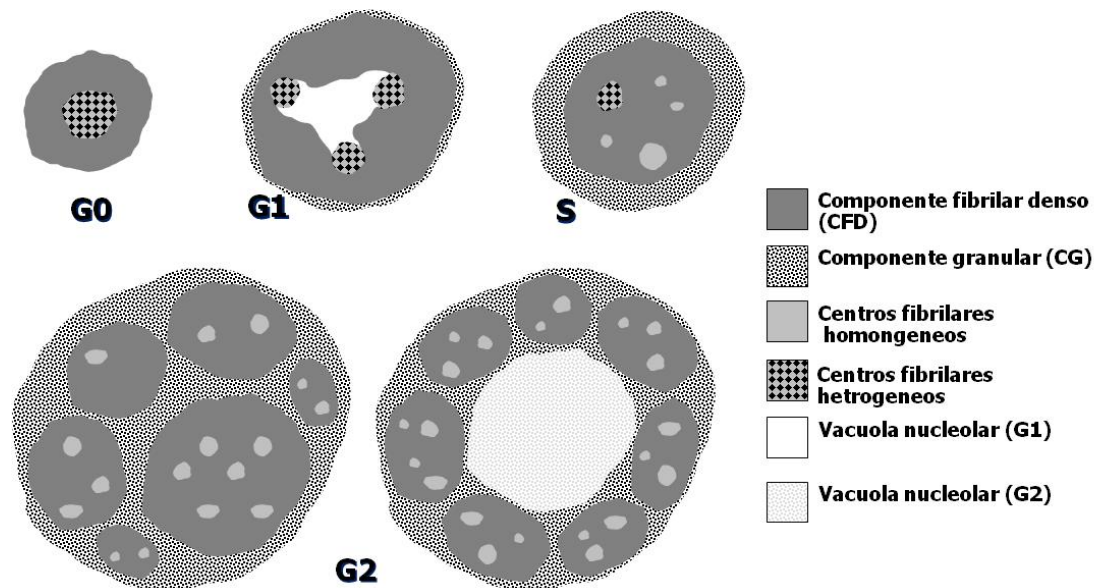


Figura 11. Modelo nucleolar en las diferentes etapas del ciclo celular. Se indica en la figura las diferentes distribuciones de los componentes nucleolares durante el ciclo celular (González-Camacho y Medina, 2006).

2.2.1 Proteínas Nucleolares

En la regulación de la biogénesis de los ribosomas desempeñan un papel esencial ciertas proteínas que interaccionan transitoriamente con el rDNA y con los diferentes intermediarios del procesamiento del pre-rRNA, no formando parte del ribosoma maduro (Olson, 1991). Estas proteínas se denominan genéricamente “proteínas nucleolares”. En este trabajo, hemos prestado atención especial a dos de ellas, la nucleolina y la fibrilarina. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la biogénesis de ribosomas y a su vez, su expresión está condicionada por el ciclo celular y por el estado proliferativo de la célula (González-Camacho y Medina, 2004; 2005) así como por el patrón de desarrollo de las plantas (Petricka y Nelson, 2007).

- *La Nucleolina*

La nucleolina es una proteína multifuncional implicada en el procesamiento del RNA ribosómico y es la proteína nuclear más abundante en las células en proliferación; además, está altamente conservada en animales, levaduras y plantas (Medina *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 1999). En la mayoría de los grupos taxonómicos existe un solo gen de la nucleolina, pero en plantas existen dos genes correspondientes a dos variantes de la proteína (*NUC-L1* y *NUC-L2*), de los que *NUC-L2* está silenciado en condiciones normales (excepto una débil expresión en algunos tejidos) y sólo se expresa masivamente cuando el gen principal está inactivo o en situaciones de estrés (Sáez-Vásquez *et al.*, 2004; Pontvianne *et al.*, 2007; Figura 12). La proteína posee tres dominios estructurales, reflejo de tres dominios funcionales (Ginisty *et al.*, 1999). El primero de ellos es el dominio N-terminal, que contiene series de secuencias ácidas que están separadas por regiones básicas (su número varía según la especie), además de contener varios lugares potenciales de fosforilación por la cdc2 quinasa (CDKA) y la caseína quinasa II (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987; Belenguer *et al.*, 1990). Esta región está implicada en la interacción con factores que controlan la transcripción del rDNA mediante su acción sobre la cromatina (Roger *et al.*, 2003). El segundo dominio, localizado en la región central de la proteína, presenta el motivo conservado de reconocimiento de RNA (*RNA Recognition Motif*, RRM, o *RNA-Binding Domain*, RBD) y por tanto está involucrado en la unión específica a RNA, tanto en el reconocimiento de RNA como en la afinidad por las secuencias del pre-rRNA (Serin *et*

al., 1996). Existen cuatro copias de este motivo en las nucleolinas de animales y dos copias en las de levaduras y plantas. Por último, el dominio C-terminal, que está muy conservado en las diferentes especies, es una región rica en glicinas y argininas, por lo que también se le denomina dominio GAR (*glycine- and arginine- rich domain*). Curiosamente, este dominio presenta un grado de homología muy bajo en la nucleolina L-2 de *Arabidopsis* respecto a la nucleolina L-1 de la misma especie y a todas las demás nucleolinas del resto de los grupos taxonómicos (Pontvianne *et al.*, 2007). Esta zona interacciona con múltiples proteínas ribosómicas (Bouvet *et al.*, 1998), así como de forma inespecífica y con baja afinidad por el RNA (Ghisolfi *et al.*, 1992; Figura 12).

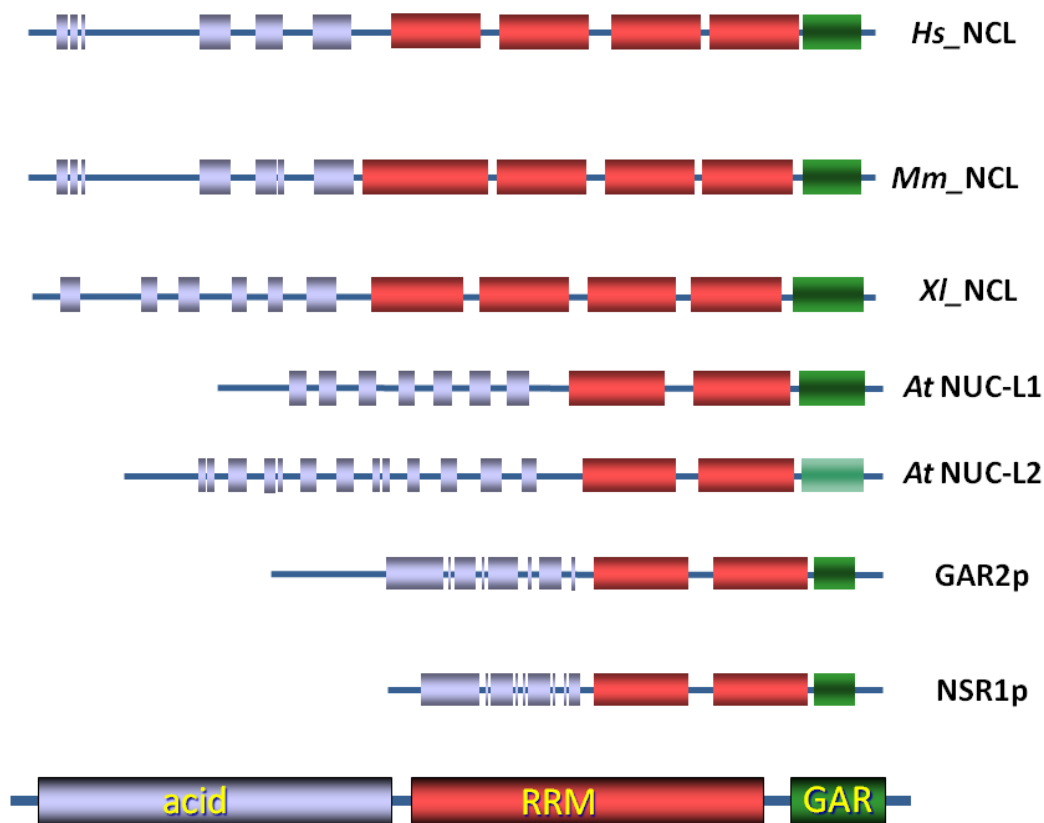


Figura 12. Representación esquemática de la estructura de los genes que codifican la nucleolina en diferentes grupos taxonómicos. Hs: humano; Mm: ratón; XI: *Xenopus*; At: *Arabidopsis* (dos variantes de nucleolina); GAR2p y NSR1p corresponden a *S. pombe* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Abajo se representan los tres dominios estructurales que se encuentran conservados en la molécula de nucleolina. Modificado de Pontvianne *et al.* (2007).

Se ha observado que los niveles de nucleolina varían en las distintas fases del ciclo celular. En mamíferos y en plantas existen niveles mínimos de la proteína en G1, que aumentan durante el período S y alcanzan su máxima expresión en G2, justo antes de mitosis, coincidiendo con la mayor tasa de producción de ribosomas (De Cárcer *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 2010). En células diferenciadas o no proliferantes, la nucleolina está presente en niveles muy bajos y se encuentra preferencialmente asociada a cromatina, aumentando sus niveles en la fase S, cuando se estimula el ciclo celular (Sirri *et al.*, 1997). En plantas la expresión de nucleolina es máxima en las células meristemáticas de la raíz, aunque también se ha detectado en otras células meristemáticas de la planta (Bogre *et al.*, 1996) y en otros órganos (Pontvianne *et al.*, 2007). La regulación de su actividad está modulada por modificaciones a nivel postraduccional, como la fosforilación (Belenguer *et al.*, 1989; Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987; Morimoto *et al.*, 2002; González-Camacho y Medina, 2004), la dimetilación (Lapeyre *et al.*, 1986) y la ADP-ribosilación (Leitinger y Wesierska-Gadek, 1993) o la glicosilación (Carpentier *et al.*, 2005). Además, la nucleolina sufre una degradación proteolítica asociada a su actividad (Bourbon *et al.*, 1983; González-Camacho y Medina, 2006).

Por otra parte, la nucleolina se localiza en el nucleolo, principalmente en el componente fibrilar denso alrededor de los centros fibrilares. Esta distribución de la nucleolina ha sido observada en varios estudios realizados con vertebrados (Lischwe *et al.*, 1981; Escande *et al.*, 1985), plantas (Martin *et al.*, 1992; Tong *et al.*, 1997; González-Camacho y Medina, 2005; 2006; Medina *et al.*, 2010; Pontvianne *et al.*, 2007; Pontvianne *et al.*, 2010), así como en levaduras (Leger-Silvestre *et al.*, 1997).

- La Fibrilarina

La fibrilarina es una proteína nucleolar básica, de unos 34-38 kDa, cuya estructura y función también está altamente conservada en diferentes eucariotas (vertebrados, levaduras y plantas), más aún que la nucleolina. Su estructura consta de dos dominios evolutivamente conservados: el primer dominio, es un motivo de reconocimiento de RNA (RRM) que está formado por dos secuencias altamente conservadas (RNP1 y RNP2; Aris y Blobel, 1991). Estas dos secuencias están

implicadas en varias etapas del procesamiento del pre-rRNA, como son, la metilación y el ensamblaje ribosómico (Tollervey *et al.*, 1993). El segundo, es un dominio GAR (dominio rico en glicinas y argininas), que parece ser el responsable de que la proteína se exporte al nucleolo (Pih *et al.*, 2000).

La fibrilarina fue localizada por primera vez en el componente fibrilar denso (Ochs *et al.*, 1985), y participa en diferentes etapas del procesamiento del pre-RNA (Cerdido y Medina, 1995; Mougey *et al.*, 1993; Stanek *et al.*, 2000; Stepinski, 2009). Está especialmente bien estudiada su actividad en el mecanismo de la escisión del espaciador transcrito externo 5' (5'ETS), en el que interviene en el cambio de configuración de la región implicada del pre-rRNA guiada por la metilación, interaccionando con los snoRNAs con caja C/D (como son los snoRNAs U3, U8 y U13), formando un complejo snoRNP activo en este proceso (Baserga, 1984). Sin embargo, su localización *in situ* (tanto en zonas proximales como distales del CFD respecto de los CFs) sugiere fuertemente que ésta no debe ser su única función en el nucleolo, sino que debe participar también en etapas más tardías del procesamiento (Cerdido y Medina, 1995; Mougey *et al.*, 1993; Stanek *et al.*, 2000).

En plantas de la familia de las crucíferas (rábano, coliflor y *Arabidopsis*) se ha identificado un factor nuclear, denominado NF D que se une al sitio de la escisión del 5'ETS (sitio P) interviniendo en este proceso. El análisis de la composición de NF D reveló la presencia en él de fibrilarina, nucleolina y los snoRNAs U3 y U14 (Sáez-Vázquez *et al.*, 2004).

De la misma forma que con la nucleolina, la expresión del gen de la fibrilarina parece ser dependiente de la actividad transcripcional del nucleolo y de la progresión del ciclo celular, por lo que los niveles de fibrilarina son mayores en células que poseen una alta actividad proliferativa (Cerdido y Medina, 1995; Medina *et al.*, 2000; Sáez-Vázquez *et al.*, 2004).

2.3. Hormonas de crecimiento

Las fitohormonas son pequeñas moléculas que modulan el crecimiento de las plantas a bajas concentraciones. Las plantas usan una amplia variedad de hormonas, incluyendo esteroides y péptidos, que se clasifican en diferentes clases: auxinas, brasinoesteroides, ácido abscísico (ABA), citoquininas, etileno, ácido jasmónico y giberelinas. Algunas de ellas ejercen un efecto positivo sobre la división y el crecimiento celular activándolo, como es el caso de, auxinas, brasinoesteroides, citoquininas y giberelinas. Sin embargo, también hay algunas que se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (ABA, etileno o ácido jasmónico) y se relacionan con la parada del crecimiento y la división celular y la iniciación de una respuesta al estrés biótico o abiótico que la motivó (Dewitte y Murray, 2003; Inze y De Veylder, 2006).

2.3.1. Las auxinas

Las auxinas son fitohormonas, que presentan la estructura común de ácido indol-3- acético (IAA). También existen variantes sintéticas como el 2,4-ácido diclorofenoxiacético y el 1-ácido naftalenoacético (1-NAA). La hormona endógena está implicada en el desarrollo embrionario, post-embrionario y en tropismos relacionados con la luz y la gravedad. También influye en procesos como la división celular, la elongación y la diferenciación celular. La presencia de auxinas condiciona la expresión de ciertos genes y las auxinas a su vez están controladas por dos grupos de genes: *ARFs* (“*auxin response factor*”, reguladores positivos) y *Aux/IAAs* (reguladores negativos; Teale *et al.*, 2006).

- Mecanismo de acción de los reguladores que median la respuesta a auxinas

Las proteínas ARFs se encuentran unidas a los elementos de respuesta a auxina (ARE, del inglés *auxin responsive elements*) en los promotores de diferentes genes. En ausencia de auxinas los Aux/IAAs están unidos a las proteínas ARFs impidiendo la transcripción de las secuencias ARE (Figura 13). Cuando se produce un aumento de la concentración de auxina en el medio se ubiquitinan los reguladores negativos AUX/IAAs y se degradan por vía proteosómica (Figura 13). Este proceso está mediado por una ubiquitina ligasa (común en múltiples rutas de degradación) y por la unión de

proteínas denominadas F-box, que son específicas de sustrato. Existen varias F-box de reconocimiento de auxinas, pero la más conocida es TIR1, que permite la transcripción de genes de respuesta a auxina según la cantidad de auxina en el medio. Existen una amplia variedad de ARFs y de AUX/IAAs y su presencia depende del tipo de respuesta, del desarrollo de la planta y del tejido. Aunque esta vía de regulación de respuesta a auxinas sea la más estudiada y mejor conocida probablemente no sea la única (Teale *et al.*, 2006).

- Síntesis, distribución y transporte polar de auxinas

Las auxinas son sintetizadas en forma de indol-acético, a partir de la ruta de metabolismo del triptófano (la mayoritaria y mejor conocida) o en menor medida a partir de otra ruta independiente, procedente de un precursor del triptófano (indol-glicerol fosfato; Woodward y Bartel, 2005). La síntesis ocurre principalmente en el meristemo apical, aunque algunos estudios muestran una síntesis minoritaria en el meristemo radicular, en las raíces primarias (Teale *et al.*, 2006; Ljung *et al.*, 2005). La cantidad de auxina que se sintetiza en la raíz no es suficiente para mantener el transporte basipétalo y por ello se necesita un mayor aporte de auxinas sintetizado en el meristemo apical (Ljung *et al.*, 2005).

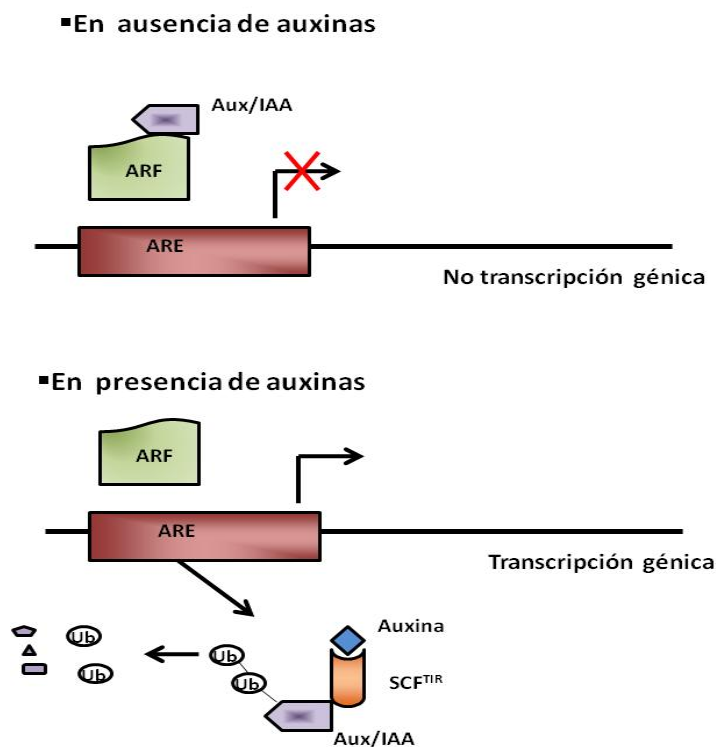
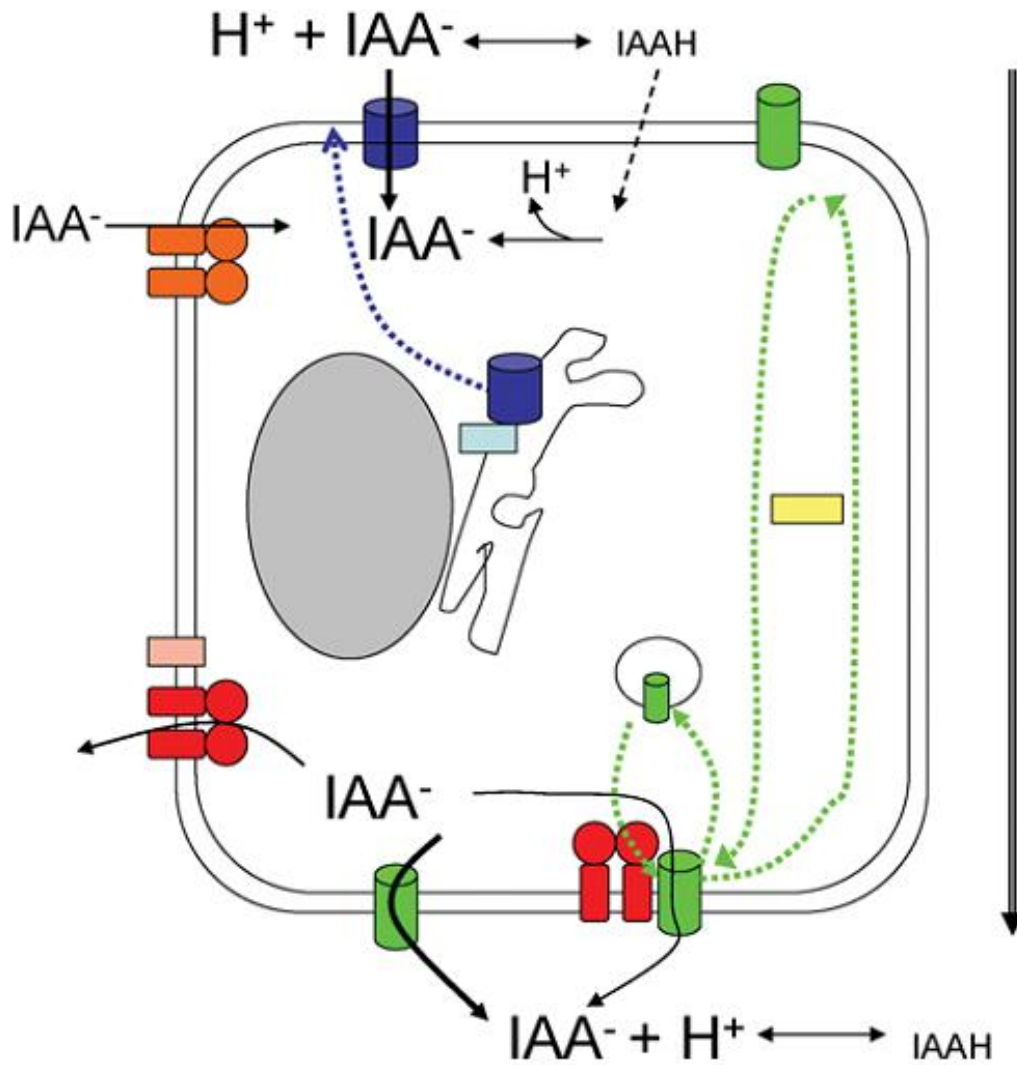


Figura 13. Mecanismo transcripcional de respuesta a auxinas. En ausencia de auxinas los reguladores Aux/IAA se encuentran unidos a los reguladores ARFs impidiendo la transcripción génica. Cuando se produce un aumento de auxinas en el medio, estos reguladores negativos son destruidos por la vía de ubiquitinación, permitiendo la transcripción génica de los promotores ARE. Modificado de Teale *et al.* (2006)

Desde el meristemo apical las auxinas son transportadas vía parénquima hacia la punta de la raíz (transporte acropétalo en la raíz), y una vez llegan a las células de la columela, donde se observa una acumulación, viajan vía epidérmica hacia la zona de elongación y las zonas diferenciadas (transporte basipétalo). Algunos estudios han revelado que la polaridad del transporte depende de la localización y posición de los transportadores celulares (de influjo o eflujo) en la membrana plasmática (Swarup *et al.*, 2001).

El transporte de auxinas tiene lugar mediante transportadores específicos localizados en la membrana celular (Teale *et al.*, 2006). Estos transportadores son AUX1, miembro de la familia de transportadores LAX (Marchant *et al.*, 1999; Swarup *et al.*, 2001), que permite la entrada de auxina en el interior de la célula (influjo) y las proteínas PIN (“*pin-formed*”; ocho en *Arabidopsis thaliana*), que se expresan a distintos tiempos y en distintas localizaciones, siendo PIN1 la mejor conocida, que permiten la salida de la auxina de la célula (eflujo; Figura 14; Friml *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 1998). La localización subcelular y asimétrica de AUX1 tiene importancia funcional y está regulada por la proteína del retículo endoplasmático AXR4 (Dharmasiri *et al.*, 2006). Por su parte, la relocalización y la actividad de PIN dependen de vesículas endosómicas y de la proteína PINOID (Benjamins *et al.*, 2001; Furutani *et al.*, 2004; Geldner *et al.*, 2001; Teale *et al.*, 2006; Figura 14). Estudios en *Arabidopsis* han mostrado que el gen de *AUX1*, que parece ser un transportador al interior de la célula simporte, se expresa en el protofloema y en la columela, tanto en el centro como en las capas laterales, y se expande a las células epidérmicas, facilitando la distribución de auxinas en el transporte acropétalo y basipétalo. La proteína PIN1 se localiza en el interior de los tejidos vasculares para el transporte acropétalo de auxinas (Galweiler *et al.*, 1998; Marchant *et al.*, 1999; Sabatini *et al.*, 1999), y PIN2 (también llamada EIR1, *ethylene insensitive root1*; Luschnig *et al.*, 1998) se encuentra en las tres capas de células corticales que forman el meristemo de la raíz facilitando el transporte basipétalo (Muller *et al.*, 1998). Se ha encontrado un tercer transportador, que pertenece a la familia ABC, aunque no está claro su papel en el transporte polar de auxinas (Kerr y Bennett, 2007).



I.D. Keer and M.J. Bennett, 2007

Figura 14. Esquema de la regulación intracelular de auxinas que permite el transporte polar. Las auxinas (en forma de anión) entran en la célula mediadas por el transportador AUX1 (cilindro azul), situado en la zona apical de la membrana plasmática, aunque también existe una pequeña entrada por difusión en forma protonada. La salida de las células está mediada vía PIN (cilindro verde). Algunas veces se puede producir una interacción de PIN con otros transportadores transmembrana, como de AtPGP1/19 (en rojo), o la interacción de AtPGP1/19 con TWD (en rosa), y el transportador AtPGP4 (naranja), que permite la entrada en la célula. La regulación de AUX1, se establece o es regulada por la proteína del retículo endoplasmático, AXR4 (flecha azul). PINOID controla la polaridad de PIN (cuadrado amarillo) y el control de la actividad mediante vesículas endosómicas (flechas verdes).

2.3.2. Respuesta hormonal al estrés biótico y abiótico

En respuesta a señales externas estimuladoras del crecimiento se activan determinadas fitohormonas como auxinas, brasinoesteroides, citoquininas y giberelinas, que activan la división y el crecimiento de las células. Las auxinas y citoquininas regulan la expresión de ciclinas claves en el ciclo celular, favoreciendo las transiciones G1/S y G2/M (Dudits *et al.*, 2011). Más concretamente, las citoquininas (reguladas por los genes *ATHK4*, *ARR4* Y *ARR7*) y los brasinoesteroides regulan el ciclo celular en la transición G1/S, regulando la expresión de *CYCD3;1* (Nakaya *et al.*, 2002; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999).

En condiciones desfavorables de crecimiento o de estrés biótico o abiótico, se sintetizan otras hormonas como el ABA (ácido abscísico), etileno o ácido jasmónico, cuya función es inhibir la división celular, las cuales normalmente actúan sobre la regulación de la transición G2/M del ciclo celular (Dewitte y Murray, 2003; Inze y De Veylder, 2006; Wang *et al.*, 1998). Además, la percepción de estrés biótico o abiótico activa la señalización del flujo de iones, la cascada de quinasas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS; Peres *et al.*, 2007).

En particular, el etileno influye en el transporte polar de auxinas en hipocotilos etiolados, afectando a los transportadores de eflujo (Suttle, 1988). Por otra parte, los factores de respuesta a la presencia de etileno están relacionados con el estrés oxidativo y se ha comprobado que la producción de ROS por estrés oxidativo, afecta a la replicación del DNA y retrasa la entrada en mitosis en células de tabaco (BY-2), así como en los meristemos apical y radicular (Reichheld *et al.*, 1999). También causa una disminución en la actividad CDK, produce un aumento de genes de respuesta a estrés y una disminución en la expresión de genes reguladores de la progresión del ciclo celular (Logemann *et al.*, 1995). Se han obtenido resultados similares en células animales (Barnouin *et al.*, 2002).

3. Problemática de la Investigación Biológica en Microgravedad

A principio de los años ochenta del pasado siglo se diseñó y abordó la construcción y ensamblaje de la Estación Espacial Internacional (ISS, *International Space Station*), lanzándose su primer módulo en 1998. Fue una iniciativa conjunta de todas las agencias espaciales existentes en el momento: la norteamericana, la rusa, la japonesa, la canadiense y la europea (ESA, *European Space Agency*). España es miembro fundador de la ESA desde 1975 y a partir de ese momento se iniciaron las contribuciones españolas a la investigación espacial. La ISS es esencialmente un laboratorio avanzado (a día de hoy el mejor dotado que se ha diseñado) para investigar los efectos del ambiente espacial, en particular de la microgravedad, sobre una gran variedad de sustratos y de procesos biológicos y físicos. Antes de este momento se utilizaban satélites y vehículos espaciales en misiones más o menos prolongadas ("*Space Shuttle*" o transbordador espacial, Estación "MIR") para la realización de experimentos espaciales. Fueron especialmente importantes los experimentos biológicos realizados en sucesivas misiones del transbordador espacial norteamericano utilizando la instalación europea denominada "Biorack" (ver el volumen 47 (2-3) de la revista *J. Biotechnol.* (1996), monográficamente dedicado a estos experimentos). La experiencia adquirida en estas misiones y con estos vehículos resultó decisiva para la iniciativa de la puesta en marcha de la ISS.

Sin embargo el acceso a la ISS está muy limitado y los recursos disponibles en cada misión espacial condicionan muy seriamente los diseños experimentales que se pueden desarrollar en microgravedad real. Ejemplos de las restricciones son condiciones ambientales subóptimas, tiempo de manipulación de los astronautas mínimo, necesidad de triple aislamiento de seguridad para sustancias químicas peligrosas, conservación en frío limitada (en tiempo y en espacio), capacidad de lanzamiento y retorno de carga...

3.1. Simuladores Inerciales de Gravedad Alterada en Tierra

En el planeta Tierra, podemos conseguir condiciones de microgravedad de buena calidad ($<10^{-4}g$) situando nuestro experimento en una torre de caída libre, un pozo o un globo aerostático y también realizando vuelos parabólicos con aviones (alternancia de periodos de microgravedad e hipergravedad). Sin embargo, la duración de la microgravedad obtenida con estos métodos es mínima (unos pocos segundos), generalmente demasiado corta para que organismos vivos, tales como, plantas, insectos o roedores, muestren cambios apreciables en los parámetros de proliferación y crecimiento celular que nos interesan (la duración de un ciclo celular en *Arabidopsis* es de unas 24 horas, Richard *et al.* (2001)). La utilización de cohetes (“*sounding rockets*”) reúne muchas de las limitaciones de la ISS en cuanto al diseño experimental, aunque es en general más barata y existen más posibilidades de acceso, y sin embargo sólo proporciona unos minutos de microgravedad.

Estas restricciones, junto con las limitaciones del acceso a los vuelos espaciales (escasez, coste muy elevado), ponen de manifiesto la necesidad de buscar alternativas para simular las condiciones de ausencia de gravedad en tierra (Hoson *et al.*, 1997). Aunque desde el siglo XVIII se desarrollaron dispositivos rotatorios dirigidos a facilitar el estudio de los efectos que causa la ingravidez, sobre el crecimiento y desarrollo en plantas y animales, no fue hasta comienzos del siglo XX cuando se desarrollaron los primeros clinostatos. Estos aparatos son dispositivos capaces de compensar el vector gravitatorio sometiendo al objeto de estudio a un giro con una determinada velocidad angular. Existen varios tipos de clinostatos que se diferencian en sus métodos de operación: de giro lento (1 rpm) o rápido (60 rpm) y en uno o dos ejes del espacio. Posiblemente el dispositivo basado en el principio físico del clinostato, más elaborado y con más versatilidad en lo que se refiere a modos de funcionamiento, es la *Random Positioning Machine* (RPM), que añade el movimiento en 2 ejes (tridimensional) a un mecanismo aleatorizado de movimientos que asegura la neutralización del vector gravedad promedio (Hoson *et al.*, 1997, van Loon, 2007). En consecuencia la RPM es poco aconsejable para estudiar problemas biológicos que ocurran en segundos (movimiento u orientación de organismos) pero válido para procesos que requieran de minutos a horas (crecimiento y proliferación celular).

También se han desarrollado otros sistemas para someter a organismos vivos al exceso de gravedad. Para ello se han construido centrífugas especialmente dedicadas para contener sistemas vitales en su interior, que alcanzan hasta 100g, y tienen capacidad para albergar plantas, animales e incluso seres humanos (Brown, 1992; van Loon *et al.*, 2005).

3.2. Simuladores basados en el Principio de Levitación Magnética

Más recientemente se ha puesto a disposición de la comunidad científica internacional la tecnología basada en un gradiente de campo magnético (HGMFs), para estudiar los efectos de la gravedad alterada. Esta tecnología ya fue utilizada por (Schwarzacher y Audus, 1973), para inducir la curvatura en raíces. La tecnología de levitación magnética tiene la ventaja de permitir estudiar diferentes condiciones de gravedad simulada al mismo tiempo y en el mismo entorno ambiental. También se pueden obtener niveles intermedios de gravedad como los de la Luna (0,16g) o Marte (0.37g), lo que es imposible con otros simuladores excepto montando una centrífuga dentro de un simulador de microgravedad, lo que acarrea la necesidad de múltiples controles externos.

El Levitador Magnético es un imán capaz de generar un campo magnético lo suficientemente fuerte como para compensar el vector gravedad, produciendo diferentes fuerzas gravitatorias efectivas, en función de la dirección que tome el vector de fuerza magnética. El efecto se basa en el denominado diamagnetismo, una propiedad de muchos materiales (por ejemplo, el agua), basada en la respuesta de los orbitales atómicos cuando se aplica un campo magnético externo. Si el gradiente de campo es suficientemente fuerte los orbitales producen su propio campo magnético en dirección opuesta. En consecuencia, los materiales diamagnéticos se orientan para que su momento bipolar sea paralelo y opuesto al campo magnético aplicado, lo que les otorga susceptibilidad magnética negativa y les hace ser repelidos por el campo magnético aplicado. Este efecto es imperceptible en la vida ordinaria, debido a la pequeña magnitud de los campos magnéticos presentes en la Tierra, pero las nuevas tecnologías (ya sea utilizando líquidos superconductores criogénicos o enormes cantidades de energía en instalaciones dedicadas) permiten generar campos magnéticos de suficiente

intensidad como para levitar un amplio rango de materiales, entre ellos seres vivos, compuestos mayoritariamente de agua. La levitación se produce gracias al efecto “magneto-Arquímedes”, es decir, el vector de fuerza magnética se opone a la gravedad de la misma forma que lo hacen las moléculas de un fluido cuando se introduce un objeto en él, de acuerdo con el principio de Arquímedes. Cuando la fuerza del campo magnético iguala a la de la gravedad se obtiene una gravedad simulada efectiva de $0g^*$ (Christianen, 2010; Hill, 2010; Figura 15).

En un Levitador magnético, como el de la Universidad de Nottingham por ejemplo, se calibra el campo magnético para que la gravedad efectiva sea:

- **$0g^*$** : en la primera posición la fuerza de campo magnético es igual al peso del objeto y en sentido contrario, lo que permite una levitación estable.

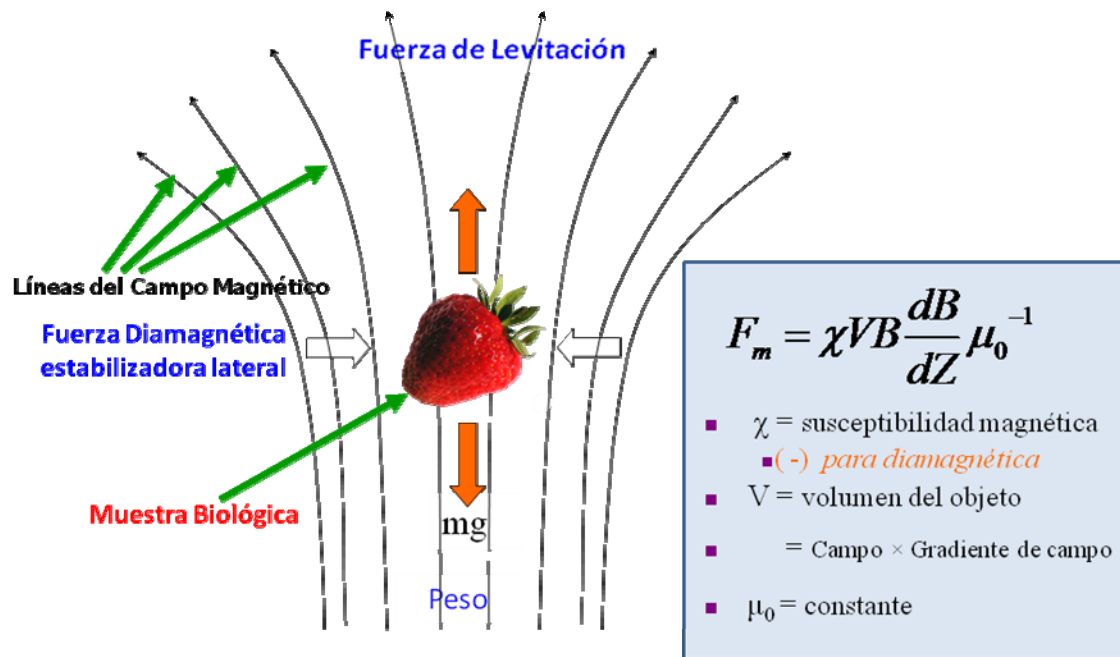
$$F_g = -F_m \text{ luego } g^* = 0 \qquad B = 12,3T$$

- **$1g^*$** : el espacio intermedio se utiliza para obtener una muestra control $1g^*$ en el interior del aparato, es decir, que está a la misma gravedad que en la Tierra pero sometida a campo magnético.

$$dB/dZ = 0 \text{ entonces } F_m = 0 \text{ luego } g^* = 1 \text{ aunque } B = 16,5T$$

- **$2g^*$** : En la última posición la muestra está sometida a una fuerza que es el doble a la de su peso, porque el campo magnético ejerce fuerza en la misma dirección que la gravedad.

$$F_g = F_m \text{ luego } g^* = 2g \qquad B = 12,3T$$



Fuerza Diamagnética: igual en magnitud y opuesta en dirección a la fuerza de la gravedad

Figura 15. Principio de levitación magnética.

4. Antecedentes: El Efecto de la Microgravedad sobre el Crecimiento y el Desarrollo de *Arabidopsis*

Nuestro laboratorio ha tenido la oportunidad de realizar un experimento en microgravedad real (ISS) y dos en microgravedad simulada (RPM) centrados en el estudio de los efectos de la microgravedad sobre la proliferación y el crecimiento celular, utilizando meristemos radiculares de plántulas de *Arabidopsis*, con anterioridad a la realización de los trabajos descritos en esta Memoria. El experimento espacial “ROOT” (“Misión Cervantes”, en el año 2003) fue realizado en la Estación Espacial Internacional (ISS) durante una misión Soyuz. Las plántulas se crecieron durante cuatro días en el interior de contenedores de tipo “Biorack”, en ausencia de iluminación, y fueron fijadas de modo semiautomático en paraformaldehído, dentro de los mismos contenedores. Como control de experimento espacial se llevó a cabo un experimento en la RPM, reproduciendo totalmente las condiciones a las que se sometió a las muestras

en el espacio. Posteriormente, se realizó un nuevo experimento en la RPM, utilizando la línea transformada CYCB1:*uidA*, germinando las semillas en placa Petri con medio de cultivo en agar y tomando muestras a los 2, 4 y 8 días tras la siembra de las semillas.

En ambos experimentos se observó un incremento en la tasa de proliferación celular y una menor actividad nucleolar, y por consiguiente, una disminución en la biogénesis de ribosomas (Figura 16; Matía *et al.*, 2010). El experimento espacial se realizó sobre plántulas de genotipo silvestre, pero la utilización de plantas transgénicas con la construcción CYCB1:*uidA* en el experimento en la RPM permitió evaluar la expresión de la ciclina B1, detectada por la reacción GUS, como un marcador de ciclo celular en la transición G2/M (Figura 16) y se observó una disminución en su expresión interpretándose como un acortamiento en la fase G2 del ciclo celular (Matía *et al.*, 2005; 2007). Por lo tanto, se concluyó que la microgravedad provoca un desacople entre estos procesos que están íntimamente relacionados en condiciones de gravedad control 1g (Manzano *et al.*, 2009; Medina y Herranz, 2010).

Estos experimentos previos, aun habiendo sido muy útiles para validar el sistema experimental y obtener los primeros datos experimentales sobre la alteración de los procesos celulares en los que está interesado nuestro Grupo, requieren confirmación en un análisis más sistemático y más completo. Con estas premisas se planteó el Proyecto de Investigación que constituye la presente Tesis. Así pues, puesto que no ha sido posible acceder a la realización de un nuevo experimento en la ISS, nos planteamos la utilización de diferentes dispositivos de alteración de la gravedad efectiva accesibles en Tierra para comparar entre sí los resultados obtenidos en cada uno, empleando abordajes experimentales de Biología Celular y Molecular más complejos que los utilizados en experimentos anteriores. Por otra parte, algunos de los métodos empleados no han sido utilizados nunca hasta ahora en condiciones de microgravedad real. La utilización de dos sistemas celulares distintos como los cultivos celulares sólidos *in vitro* y las células del meristemo radicular de la raíz, ambos pertenecientes a la especie vegetal modelo *Arabidopsis thaliana*, permite la realización de un más amplio abanico de técnicas de análisis y hace posible la distinción entre mecanismos de respuesta a la gravedad alterada que involucran a diferentes órganos de la planta y otros que son exclusivamente producidos por las células indiferenciadas individuales.

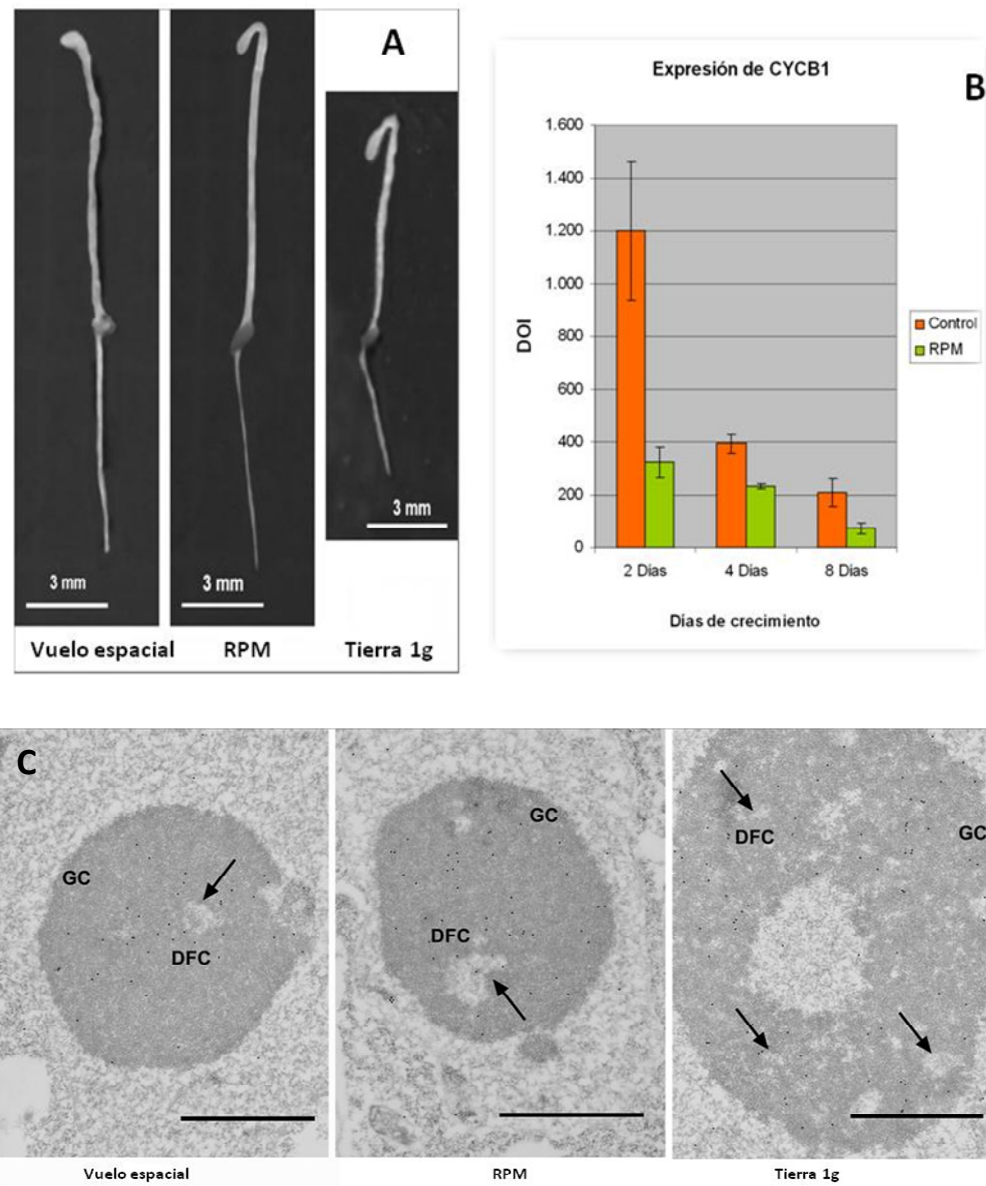


Figura 16. Resultados del experimento realizado en la ISS, durante la “Misión Cervantes”. A) Longitud de las plántulas con 4 días de crecimiento en las diferentes condiciones de desarrollo. B) Diferencias de expresión de la β -glucuronidasa en plantas transgénicas con la construcción CYCB1:*uidA* a diferentes días de crecimiento. C) Tamaño nucleolar en las diferentes condiciones experimentales con plántulas de 4 días de crecimiento. Tomado de Matía *et al.*, 2010.

OBJETIVOS

La alteración de la gravedad, un factor ambiental esencial y permanente al que están sometidos los seres vivos en la Tierra, modifica el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estas funciones vitales de los organismos tienen una base celular y molecular de modo que, para que una planta crezca y se desarrolle adecuadamente, es necesario que en sus tejidos meristemáticos se produzca una adecuada proliferación celular acoplada a un equilibrado crecimiento celular, basados, a su vez, en la acción coordinada de numerosos factores que regulan el progreso del ciclo de división celular y la biosíntesis de proteínas. Estas funciones celulares son sensibles a la alteración de la gravedad mediante mecanismos todavía escasamente conocidos en la actualidad.

Así pues, el objetivo central de esta Tesis es estudiar sistemáticamente los efectos de un ambiente de gravedad alterada (microgravedad e hipergravedad), sobre los procesos de **proliferación celular, crecimiento celular, ciclo celular y la expresión génica y síntesis de proteínas, en dos modelos biológicos de células proliferantes vegetales**, el meristemo de la raíz y el cultivo celular *in vitro*, ambos pertenecientes a la especie vegetal modelo *Arabidopsis thaliana*. El estudio planteado a nivel celular y molecular proporcionará algunas claves sobre el papel que desempeña la gravedad sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, que serán de utilidad en el conocimiento de las relaciones entre los seres vivos y el medio ambiente, en el mejor aprovechamiento del cultivo de las plantas por el ser humano y en el progreso de la exploración espacial y la utilización inteligente del espacio.

Para alcanzar este objetivo central planteamos cinco objetivos secundarios:

1. Consolidar, extender y ampliar estudios previos en microgravedad real y simulada, realizados en la Estación Espacial Internacional (ISS) y en una *Random Positioning Machine* (RPM), respectivamente, sobre la proliferación, el crecimiento y el ciclo celular en el meristemo radicular de plántulas. Para ello se utilizará un nuevo dispositivo simulador de microgravedad basado en el fenómeno físico de la levitación diamagnética del agua y se extenderán por primera vez los estudios a los efectos de la hipergravedad sobre estos procesos biológicos, tanto en el Levitador magnético como en otro nuevo dispositivo específico de esta alteración, la Centrífuga de Gran Diámetro (LDC). La comparación con estudios anteriores se hará posible mediante la utilización, en estos experimentos, de las mismas técnicas de análisis de las muestras que se utilizaron anteriormente.
2. Identificar cambios inducidos por la alteración de la gravedad en la progresión del ciclo celular, en el patrón transcriptómico (cambios en la expresión de genes específicos) y en el patrón proteómico (cambios en la identidad, en los niveles y en las propiedades de determinadas proteínas). Para ello se utilizarán, tanto plántulas completas como cultivos celulares *in vitro* compuestos de poblaciones homogéneas de células proliferantes. Las alteraciones que se pretende identificar lo serán, tanto a nivel global (genoma y proteoma completo) como respecto de genes o proteínas específicos, involucrados en proliferación y crecimiento celular.

3. Discriminar entre los mecanismos de respuesta a la alteración de la gravedad basados en la transducción de señales entre distintos tejidos y órganos especializados, cuyo destino final son las células proliferantes, y la respuesta a estímulos percibidos directamente por células que no están particularmente especializadas en la percepción de la gravedad. Esta discriminación será posible mediante la utilización de dos modelos celulares en proliferación, el de las células meristemáticas de la raíz (*in planta*) y el de las células MM2d en cultivo *in vitro*. Las células meristemáticas de la raíz están conectadas e intercambian señales con los receptores especializados de la señal mecánica gravitatoria, integrados en el mecanismo del gravitropismo (estatocitos), y con el transporte polar de auxinas, entre otros sistemas reguladores del crecimiento y desarrollo a nivel de la planta completa. Por el contrario, las células en cultivo constituyen una población homogénea de células proliferantes que vive en unas condiciones ambientales constantes, tanto físicas como en cuanto a los constituyentes del medio de cultivo.

4. Confirmar la utilidad de cada uno de los diferentes simuladores utilizados, basados en diferentes principios físicos, considerando los resultados previos en microgravedad real obtenidos en la ISS.

5. Participar en la optimización de protocolos y la generación de plantas transgénicas, utilizando la tecnología del ADN recombinante, con elementos reporteros fluorescentes asociados a los promotores de diferentes genes marcadores de crecimiento y proliferación celular, utilizables en experimentos en Tierra o en futuros experimentos espaciales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico
2. Anticuerpos, plásmidos y oligonucleótidos
3. Instrumentación
4. Técnicas de microscopía óptica
5. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión
6. Citometría de flujo
7. Técnicas de genómica
8. Técnicas de proteómica
9. Análisis estadístico
10. Generación de plantas transgénicas
CYCB1:GFP y AtNUC-L1:GFP
11. Diseño de experimentos realizados en diferentes
GBF Europeas (*Ground Based Facilities*; Instalaciones
de Simulación de Microgravedad en Tierra)

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Líneas de plantas y construcciones genéticas utilizadas.

El presente trabajo se realizó sobre la especie vegetal modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo “Columbia” (Col 0). Se utilizaron diferentes líneas de plantas conteniendo diversas construcciones genéticas, las cuales se describen a continuación:

- Línea de genotipo silvestre Col 0 (denominada *wild type*).
- Línea transformada con la construcción genética *CYCBI:uidA*, que lleva un inserto de un gen reportero “GUS” bajo el control del promotor de la ciclina B1 (Ferreira *et al.*, 1994), facilitada por la Dra. Eugénie Carnero-Díaz (Universidad Pierre et Marie Curie, Paris VI, Francia).
- Línea transformada con la construcción genética *DR5:uidA*, (Ulmasov *et al.*, 1997; Sambrook *et al.*, 1989), que lleva un inserto de un gen reportero “GUS” bajo el control de un promotor de respuesta a auxinas, suministrada por la Dra. Eugénie Carnero-Díaz (Universidad Pierre et Marie Curie, Paris VI, Francia).

Las semillas se esterilizaron con hipoclorito sódico 1,25% (v/v) y Tween 20 al 1% (v/v) diluidos en agua bidestilada (mili-Q) durante 10 min. Posteriormente se realizaron 4 lavados con agua mili-Q (30 min cada lavado).

Las germinación de las semillas se llevo a cabo en un medio estéril compuesto por Murashige y Skoog (MS; Duchefa; referencia: P00403.01) suplementado con sacarosa (10 g/l), MES (0,5 g/l), así como agar al 0,8% (p/v) tras ajustar el pH a 5,6. En el protocolo estándar de cultivo, las plántulas crecieron a 22° C, con una humedad relativa del 80% y un fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad (máximo 3 semanas antes de trasplantar a sustrato con vermiculita si se requiere la recolección de semillas). Dependiendo de las exigencias de cada experimento estas condiciones pueden cambiar, así como, el tiempo de crecimiento de las plántulas.

1.2. Crecimiento de la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* ecotipo "Columbia" (Col 0), manipulación y obtención de semillas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en tierra suplementada al 50% con vermiculita (formada por minerales), para facilitar el crecimiento y la aireación. Se deja crecer a las plantas hasta obtener los frutos (silicuas). Son unas vainas cerradas el doble de largas que de anchas con las semillas en su interior. Se cortan las plantas y se dejan secar un mes sin cubrir. Se recogen las semillas y se almacenan a temperatura ambiente.

1.3. Cultivo celular *in vitro* en suspensión procedente de la especie vegetal *Arabidopsis thaliana*, ecotipo "*Landsberg erecta*" (MM2d).

Este cultivo celular vegetal procedente de la especie *Arabidopsis thaliana* se utilizó según el protocolo descrito por May y Leaver (1993). El cultivo celular crece en el medio específico de Murashige y Skoog (incluye vitaminas y MES; Duchefa Biochemies; referencia: MO255.0010), suplementado con: 3% (p/v) sacarosa, vitaminas (*Vitamin mixture* 1000x; Duchefa; referencia: M. 0409), 0,5 mg/l NAA (*α -naphthalene acetic acid*; Duchefa Biochemies; referencia: N0903.0025) y 0,1 mg/l Kinetina (Duchefa Biochemies; referencia: K0905.0001), se ajusta el pH a 5,8 y se esteriliza a 110°C. Los 50 ml de cultivo se mantienen creciendo durante 7 días en oscuridad, a 27°C y en agitación a 120 rpm. Cada semana se mantienen 50 ml de cultivo celular diluyéndolo 1:20 con medio de cultivo nuevo y estéril.

1.4. Cultivos *in vitro* de callos vegetales procedentes del cultivo celular MM2d

Para inmovilizar el cultivo vegetal de *Arabidopsis thaliana* se fomentó la aparición de la forma resistente del callo. Para ello se añadió una alícuota del cultivo celular crecido durante 7 días a un tubo falcon de 50 ml, se dejó decantar la solución de células, posteriormente se desechó el sobrenadante y se tomó el extracto celular añadiéndolo a una placa de cultivo que lleva el medio Murashige y Skoog (incluye

vitaminas y MES; Duchefa Biochemies; referencia: MO255.0010), suplementado con: 3% (p/v) sacarosa, vitaminas (*Vitamin mixture 1000x*; Duchefa; referencia: M. 0409), 0,5 mg/l NAA (*α -naphthalene acetic acid*; Duchefa Biochemies; referencia: N0903.0025) y 0,1 mg/l Kinetina (Duchefa Biochemies; referencia: K0905.0001), a pH 5,8 y se esterilizó a 110°C en autoclave.

2. ANTICUERPOS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

2.1. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en los experimentos de inmunocitoquímica indirecta y *Western-blot* descritos en el presente trabajo fueron cedidos por el Dr. J. Sáez-Vásquez (Sáez-Vásquez *et al.*, 2004; Pontvianne *et al.*, 2007), y se describen a continuación:

anticuerpo Anti-nucleolina:

- anti-AtNUC-L1 policlonal, generado en conejo contra la región de reconocimiento de RNA (RRM) de la proteína *nucleolin-like* AtNUC-L1.
- anticuerpo Anti-AtNUC-L1 (p), policlonal, generado en conejo contra un péptido de la región C-terminal, rica en glicina y arginina (GAR), de la proteína AtNUC-L1.

Los anticuerpos secundarios utilizados para el revelado de los sitios de unión de los anticuerpos primarios, fueron:

- anticuerpo IgG de cabra Anti-IgG de conejo (H+L) unido a partículas de oro de 12nm (Jackson Immuno Research). Utilizado para la visualización a microscopía electrónica.
- anticuerpo IgG de burro Anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano picante para ECL (GE Healthcare). Utilizado en *Western blotting*.

La detección de los anticuerpos primarios requiere utilizar un anticuerpo secundario específico, conjugado adecuadamente y a la concentración idónea en cada técnica para optimizar los experimentos.

Tabla 1. Diluciones y anticuerpos utilizados. Se muestran las distintas diluciones de anticuerpos que hemos utilizado dependiendo de la técnica.		
Anticuerpo	<i>Western-blot</i>	<i>Inmunocitoquímica</i>
Primario	anti-AtNUC-L1 (1:1000)	anti-AtNUC-L1 (p) (1:100)
	anti-AtNUC-L1 (p) (1:2000)	
Secundario	anti-Rabbit IgG-Peroxidasa (1:5000)	anti-Rabbit IgG-oro 12nm (1:40)

2.2. Plásmidos

A continuación se describen los plásmidos utilizados para la obtención de plantas transgénicas que expresan CYCB1:GFP y AtNUC-L1:GFP:

- Plásmido pGEM-T Easy

El plásmido pGEM-T Easy (Promega), es un plásmido comercial que permite amplificar la secuencia que se quiere clonar muy fácilmente, debido a que es un plásmido pequeño y que posee una base T libre en los extremos que permite ligar con los extremos con una base A libre que deja la enzima "taq" polimerasa después de amplificar un fragmento de DNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto permite una fácil identificación de las colonias que hayan insertado el plásmido, pues contiene el gen de resistencia a ampicilina y el gen reportero/marcador *LacZ* (su expresión da coloración azul a la colonia en presencia de IPTG; Figura 17).

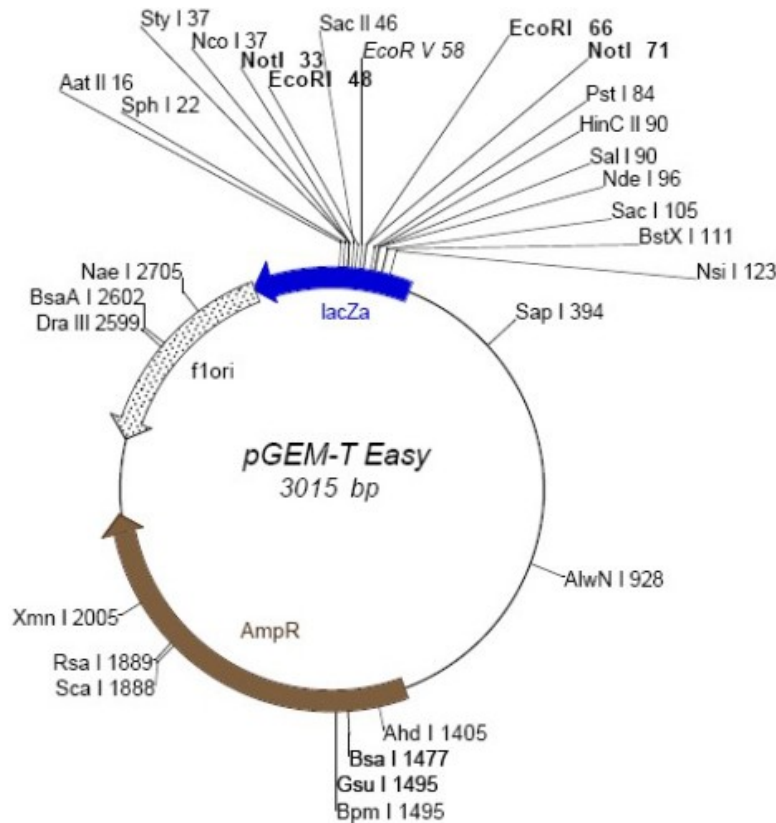


Figura 17. Mapa del plásmido pGEM-T Easy. El plásmido pGEM-T Easy tiene un tamaño de 3015 pb y consta de un origen de replicación procariota, un gen de resistencia a ampicilina y un gen *LacZ*. Se representan las dianas de restricción del plásmido, teniendo un *polilinker* en el interior del gen *lacZ*.

- Plásmido pBIN 35S-mGFP

Para introducir una secuencia de interés en las plantas de *Arabidopsis thaliana* usamos un plásmido binario que fuese capaz de expresarse en organismos eucariotas y procariotas. El plásmido pBIN 35S-mGFP consta de una región de T-DNA, flanqueada por los extremos LI y LT, que se aprovecha de la maquinaria infectiva de *Agrobacterium tumefaciens* para insertarse en el genoma de una célula eucariota una vez que haya sido introducido en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 18 y 19)

Elegimos como plásmido binario el PBIN 35S-mGFP4 (Haseloff *et al.*, 1997), porque lleva ya la secuencia GFP que queremos introducir, por tener unas dianas de restricción de interés (Hind III y BamHI) y porque permite la selección en placa por resistencia a kanamicina (Figura 18).

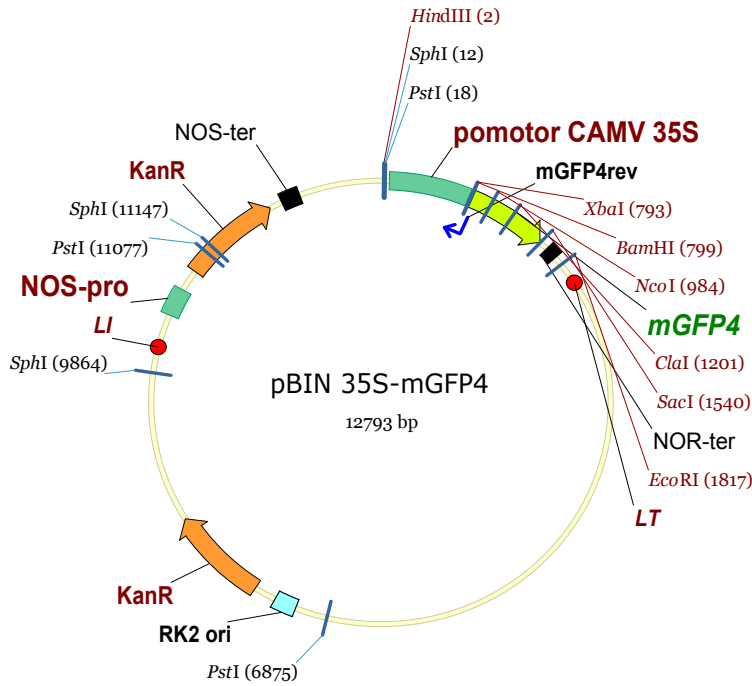


Figura 18. Mapa del plásmido pBIN 35S-mGFP4. Tiene un tamaño de 12793 pb y está formado por dos partes: una parte consta de un origen de replicación procarionta y un gen de resistencia a kanamicina; la otra parte está formada por la región T-DNA, que tiene un origen de replicación eucariota, un gen de resistencia a kanamicina y el promotor 35S seguido de la secuencia mGFP4. También se representan en el esquema del plásmido las dianas de restricción.

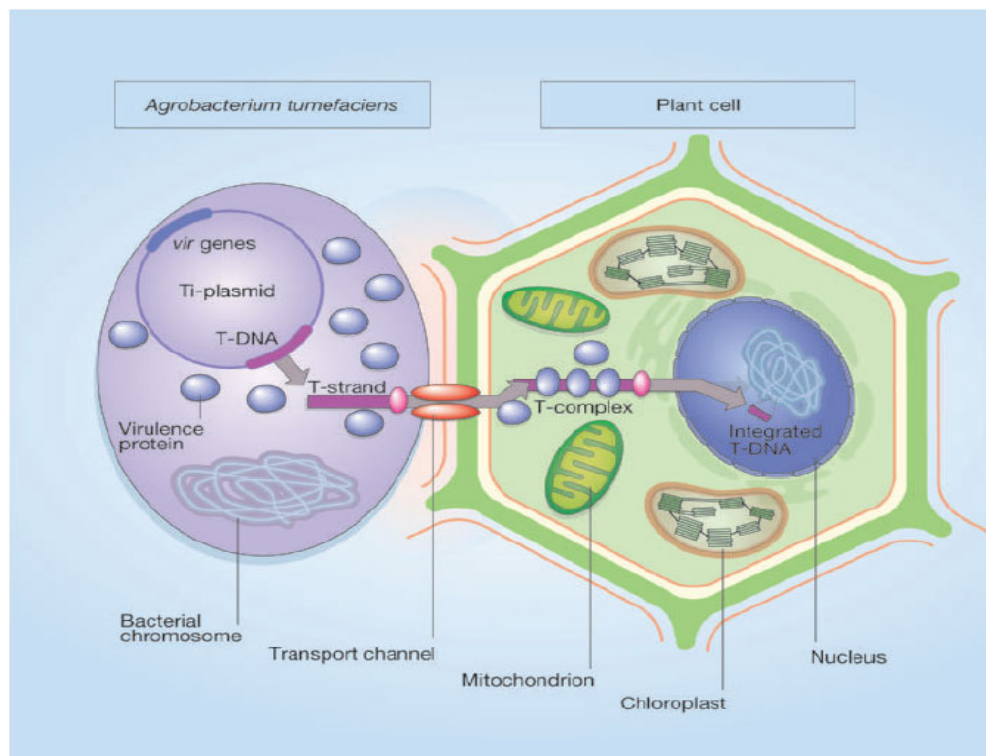


Figura 19. Mecanismo de infección por *Agrobacterium tumefaciens*. Las células competentes bacterianas poseen secuencias específicas de virulencia (plásmido con genes VIR y un locus de virulencia cromosómica) que reconocen los extremos del T-DNA. Esto le permite a *Agrobacterium tumefaciens* infectar a la célula de la planta con los genes que se encuentran insertados en el T-DNA del plásmido; posteriormente esta secuencia es capaz de insertarse en el genoma de la célula vegetal (Stachel *et al.*, 1986)

2.3. Diseño de oligonucleótidos, cebadores o "primers"

Indicamos a continuación las secuencias de los oligonucleótidos utilizados que se diseñaron con ayuda de los programas de libre acceso en Internet, *PREMIER Biosoft International* y *Primer 3 Plus*.

- Para obtención de plantas transgénicas (cebadores directos, (for) o invertidos (rev)):

AT4G37490,1 (CYCB1;1)

Cybc1; 1:GFP(for): 5' AAGGTAGTGCAATGCTGAGATTT 3'

Cybc1; 1:GFP(rev): 5' GGATCCATCTTAGTGTTCTCTTCTTTCT 3'

Cybc1; 1:GFP(for2): 5' CTACACCACACCATGCAATG 3'

AT1G48920,1 (AtNUC-L1)

Nuc-L1 (for): 5' TAACCAAGTCAAGCTTTGAATATATGTT 3'

Nuc-L1 (rev): 5' GGATCCCATGGAGAACTGAGAAAGAGA 3'

U87624.1 (mGFP4)

mGFP4 (rev): 5' TCAACAAGAATTGGGACAACTC 3'

- Para RT-PCRq (PCR cuantitativa, cebadores directos (for) o invertidos (rev))

AT4G37490,1 (CYCB1;1)

Ciclina B1 (for): 5' CAGCAATGGAAGCAACAAGA 3'

Ciclina B1 (rev): 5' ATGCAGTGTTTGGGAATGAA 3'

AT1G48920,1 (AtNUC-L1)

Nuc-L1 (for): 5' CCGAGAGGAGATAGCAGTGG 3'

Nuc-L1 (rev): 5' TCCACGACCACGATCACTT 3'

AT5G52470,1 (AtFIB1)

AtFib (for): 5' CGTCTTTCGTTCTTCACTTTTAGACAAG 3'

AtFib (rev): 5' GCCCACTACGGCCTCTGTCA 3'

AT3G18780,1 (ACTIN-2)

Actin (for): 5' GCACCCTGTTCTTCTTACCG 3'

Actin (rev): 5' ATCCAGCACAATACCGGTTGTA 3'

3. INSTRUMENTACIÓN

Los experimentos en condiciones de microgravedad simulada o hipergravedad que se describen en la presente Memoria se han realizado en los dispositivos e instalaciones que se describen a continuación:

3.1 Levitador magnético localizado en la Universidad de Nottingham (Oxford Instruments, Abingdon, UK)

El aparato es un imán con la forma de un gran cilindro metálico que genera un campo magnético de 16.5T utilizando la tecnología de líquidos superconductores. Está dotado de un sistema criogénico consistente en un circuito cerrado de helio líquido (superconductor) y de un orificio cilíndrico en el centro de 5 cm de diámetro, donde se puede controlar la temperatura, en el que, mediante un dispositivo fabricado a medida, se introducen los tubos que contienen las muestras (25 mm de diámetro x 55 mm) en distintas posiciones (Hill, 2010). La ventaja de este levitador es que, gracias al sistema de refrigeración, puede operar ininterrumpidamente durante días, e incluso meses, por lo que permite tratamientos de larga duración, sólo limitados por la presión de utilización del aparato por diferentes grupos de investigación internacionales. Hemos utilizado este equipo en experimentos de germinación de semillas y crecimiento de plántulas durante varios días, en condiciones de ausencia de iluminación.

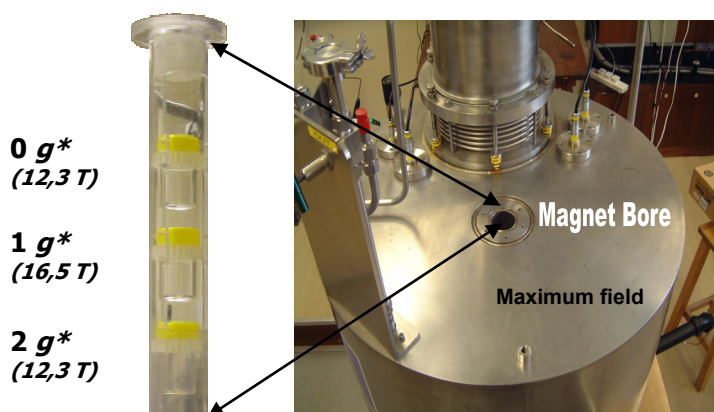


Figura 20. Fotografía del Levitador magnético de Nottingham. El Levitador Magnético tiene un orificio cilíndrico central (5 cm de diámetro) donde se introducen las distintas muestras en condiciones de gravedad efectiva (g^*) correspondientes a $0g^*$, $1g^*$ y $2g^*$.

3.2. Levitador magnético localizado en la Universidad Radboud de Nijmegen (poly-bitter magnet, High Magnetic Field Laboratory (HFML), Nijmegen, Holanda)

Este aparato utiliza una alta fuerza electromagnética para poder generar un campo magnético de 16,5T. Para ello se requiere un alto consumo eléctrico de unos 5,80 MW lo cual resulta en una importante restricción al horario de su utilización. Además, el sistema necesita refrigerarse con un flujo de 142 L/s de agua fría a 12°C (Christianen, 2010; Figura 21) por lo que no puede operar normalmente durante más de 4-5h consecutivas. Este levitador también posee un cilindro central donde se introducen los tubos a diferentes distancias del centro del aparato (Campo máximo) y según estén colocados (25 mm de diámetro x 41mm) tendrán diferencias en el campo magnético y en la gravedad simulada efectiva. Este sistema nos permitió obtener 5 posiciones diferentes de gravedad simulada efectiva y también de campo magnético (Figura 22):

- 0g* y 0,1g*: En estas posiciones se compensan las fuerzas gravitatorias, aplicándose un campo magnético de 10,1T (máximo gradiente) y 14,7T, respectivamente.
- 1g*: Control interno del aparato, sin alteración de la gravedad efectiva. Esta posición está afectada por un fuerte campo magnético de 16,5T.
- 1,9g* y 2g*: En estas posiciones, la fuerza que se aplica debida al campo magnético se añade a la gravitatoria, llegando a doblarla. El campo magnético presente es similar al de las posiciones de microgravedad, 14,7T y 10,1T, respectivamente.

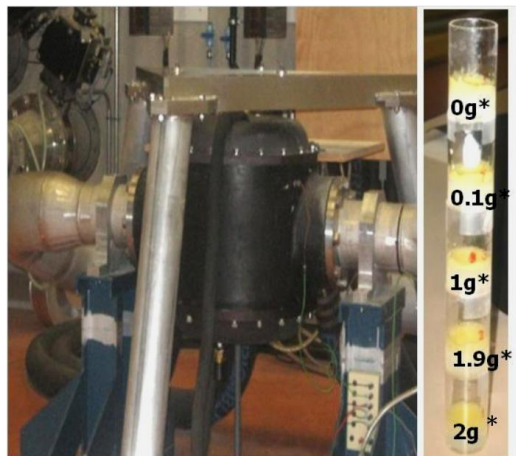


Figura 21: Fotografía del Levitador magnético de Nijmegen. El Levitador Magnético posee un orificio cilíndrico central (5 cm de diámetro) donde se introducen las distintas muestras: 0g*, 0,1g*, 1g*, 1,9g* y 2g*.

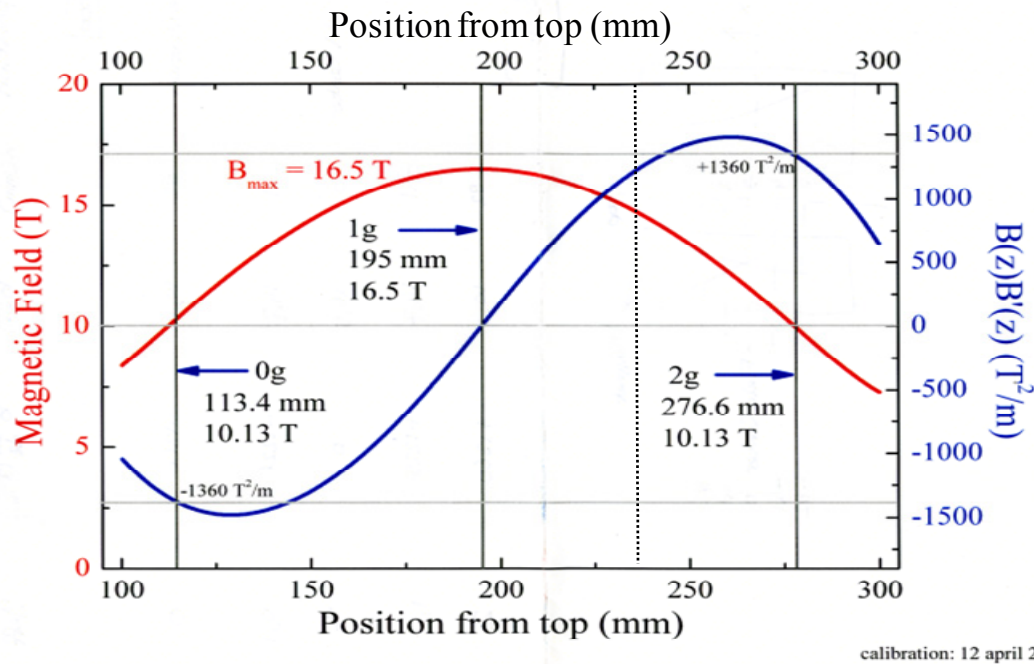


Figura 22. Gráfica del campo magnético y de la gravedad efectiva. Distribución del campo magnético y de la gravedad efectiva a lo largo del cilindro en el que se insertan las muestras en el interior del aparato. La parte derecha se corresponde con la parte de abajo en la colocación de los tubos, como se representa en la figura 21.

3.3. Random Positioning Machine (RPM), ESA-ESTEC (Holanda)

La RPM es un simulador de microgravedad que se basa en la rotación aleatoria de la muestra en torno a dos ejes con objeto de cambiar al azar la dirección del eje de gravedad, según es percibido por el organismo vivo insertado en ella, de un modo tan frecuente que sobrepasa la capacidad de detección de los sistemas biológicos sensores de la gravedad y, en la práctica, el organismo se comporta como si no hubiera ningún estímulo gravitatorio. Se ha estimado que, en el punto en el que se cortan los dos ejes de rotación ± 5 cm, la gravedad residual detectada por el ser vivo es de $10^{-4}g$ (van Loon, 2007), del mismo orden que la microgravedad espacial. La RPM consta de dos marcos cuadrados que rotan por la acción de dos motores independientes. Mediante un ordenador se establece la velocidad angular del sistema en función de la velocidad de la respuesta biológica que queramos estudiar (se requiere más velocidad para sistemas biológicos que responden más rápido a los cambios del vector gravitatorio aunque se producen más fuerzas mecánicas inerciales) y se garantiza que la dirección de rotación

de cada uno de los marcos y el intervalo de cambio de dirección sean estrictamente al azar. La RPM está situada en el interior de un incubador para poder controlar las condiciones ambientales de luz y temperatura (Figura 23).

3.4. Centrífuga (LDC) ESA- ESTEC (Holanda)

El mecanismo más sencillo para crear hipergravedad con niveles controlados de g es la utilización de una centrífuga. La Centrífuga de Gran Diámetro (LDC) del Centro ESTEC de la ESA (Figura 24) es lo suficientemente grande para permitir la realización de experimentos biológicos con animales de tamaño medio, pero más importante que esto es la minimización de las fuerzas laterales (*Shear forces*) que se generan durante la rotación (van Loon *et al.*, 2004) cuando aumenta el diámetro de la centrífuga. Dependiendo de la velocidad de rotación se pueden conseguir distintos niveles de gravedad aumentada desde $2g$ a $20g$. La centrífuga está dotada de unas góndolas donde se introduce el material, con una capacidad de $80kg$, que disponen de sensores de aceleración y de temperatura. Además, su tamaño permite acoplar equipos de microscopía y video cuya señal se puede registrar externamente gracias a conexiones AV/VIDEO y USB.



Figura 23. La *Random Positioning Machine (RPM)* del Centro ESTEC de la ESA en Noordwijk (Holanda) con unas muestras colocadas en el area central de microgravedad simulada.

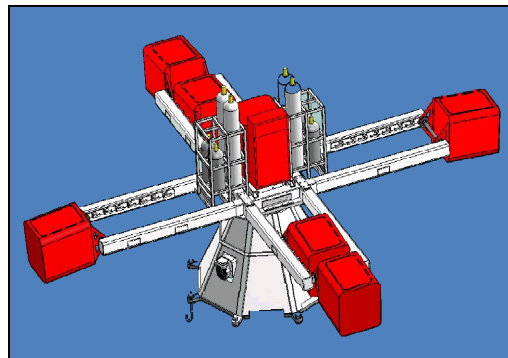


Figura 24. Gráfico de la Centrífuga de Gran Diámetro (LDC) del Centro ESTEC de la ESA en Noordwijk (Holanda). En rojo se representan las góndolas donde se introduce el material experimental.

4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

4.1. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (Gus) en líneas transformadas

Como se ha indicado anteriormente, se han realizado experimentos con líneas transformadas con el denominado gen reportero (*reporter gene*) GUS (β -glucuronidasa o uidA). A este gen se le denomina “reportero” porque es capaz de dar coloración azul, al añadirle un sustrato específico (X-Glc A), en tejidos donde se está expresando el gen y donde se activa el promotor, lo cual permite la visualización *in situ* al microscopio de la actividad del promotor génico.

Las plántulas que contenían la construcción del promotor *DR5* o *CYCB1* con el gen reportero “GUS” se fijaron con acetona al 90% a -20°C durante toda la noche. A continuación se lavaron dos veces (10 min/lavado) con buffer fosfato 100 mM y fueron incubadas con solución de revelado de actividad GUS (ferrocianuro potásico trihidratado 5 mM, ferrocianuro potásico 5 mM, buffer fosfato 100 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-ácido glucurónico (X-Glc A) 40 mM (ref: X1405.0100 Duchefa biochemies), durante 18 h, a 37°C y en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo se hicieron tres lavados de 10 min cada uno con buffer fosfato 50 mM, para proceder a su montaje con glicerol en portas “10-well-8mm”. Estas preparaciones fueron visualizadas con una lupa binocular Leica S6D y con un microscopio Leica DM2500 acoplado a una cámara digital CCD Leica DFC320. Se tomaron fotografías digitales en microscopía óptica de campo claro, en las mismas condiciones de ajuste del microscopio y del software de captura: aumentos ($\times 20$), apertura de diafragma, iluminación, saturación, brillo y ganancia. Estas imágenes se procesaron para estudios cuantitativos con el software de análisis de imágenes QWin Standard (Leica Microsystems) y con el programa Image J 2.0 (imagejdev.org). El mecanismo de cuantificación se basó en medir el área de la zona teñida y la densidad óptica del azul (D.O), obteniéndose la densidad óptica integrada (D.O.I) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{D.O.I} = \text{área teñida} \times \text{densidad óptica (D.O)}$$

5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

5.1. Preparación de las muestras

5.1.1. Método convencional

Las plántulas fueron fijadas durante 2h a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4% (v/v) en tampón fosfato salino (PBS; pH: 7,2) suplementado con glutaraldehído al 0.5% (v/v). Alternativamente se fijaron con Glutaraldehído al 3% (v/v) para optimizar la visualización de la ultraestructura nucleolar. A continuación se realizaron tres lavados de 10 min cada uno en PBS y se procedió a la deshidratación en una serie de alcoholes de concentración ascendente: etanol al 30% (v/v) y 50% (v/v) durante 30 min cada uno a temperatura ambiente y en etanol al 70% (v/v) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se continuó la deshidratación con un tratamiento en etanol de 90% (v/v) y tres de 1 h cada uno en etanol de 100% (v/v), todos a 4°C. Posteriormente se procedió a la infiltración de las muestras en resina LR White (London Resin Company). En primer lugar se sumergieron las plántulas en una mezcla de etanol 100% y resina en proporción 2:1 (v/v) durante 2 h y, una vez pasado ese tiempo, en proporción etanol 100%/ resina 1:2 (v/v) durante otras 2 h. Finalmente las muestras se introdujeron en resina pura durante dos o tres días, con cambios de resina cada 12 h. Una vez infiltradas se cortaron las raíces (por su parte terminal) y se incluyeron en cápsulas de gelatina con LR White orientadas las raíces transversalmente en el fondo de la cápsula. La polimerización se realizó en estufa a 60° C durante 22 h.

5.1.2. Método de Metilación-Acetilación

El protocolo de metilación-acetilación está basado en el descrito por (Testillano *et al.*, 1995; Testillano *et al.*, 1991). La fijación y deshidratación hasta 70% se realizó por el método descrito en el apartado anterior. Posteriormente se continuó la deshidratación con el metanol al 100% (3 lavados de 30 min cada uno) y las muestras se dejaron toda una noche en una solución de metanol-anhídrido acético 5:1 (v/v) a 25°C. Al día siguiente se lavaron tres veces con metanol al 100% durante 30 min cada una y se procedió a la infiltración y a la inclusión de la misma forma que por el método convencional (5.1.1).

5.2. Microscopía óptica sobre cortes, tallado y ultramicrotomía

Con objeto de realizar estudios estructurales a microscopía óptica y, en su caso, con el fin de localizar la zona más apropiada para el estudio ultraestructural, se realizaron cortes semifinos de 2 μm de espesor sobre los bloques incluidos en LR White visualizados por contraste de fase con un microscopio Leica DM2500 acoplado a una cámara digital CCD Leica DFC320. Las imágenes obtenidas se procesaron para estudios cuantitativos con los programas de análisis de imágenes QWin Standard (Leica Microsystems) e Image J 2.0 (imagejdev.org). Cuando se trataba de continuar el estudio a microscopía electrónica, sobre la zona elegida se talló una pirámide con un "Pyramitome LKB 11800" para realizar a continuación cortes ultrafinos en un ultramicrotomo "Reichert Ultracut E", que se montaron sobre rejillas de níquel recubiertas de una película de Formvar (TAAB).

5.3. Inmunocitoquímica para microscopía electrónica

Los cortes ultrafinos montados sobre las rejillas de níquel fueron prelavados con tampón fosfato salino con Tween20 al 0,05% (v/v; PBS-T) antes de ser lavados con una solución de bloqueo compuesta de PBS-T y seroalbúmina bovina (BSA) al 2% (p/v), durante 30 min. Posteriormente fueron incubados con el primer anticuerpo, anti-AtNUC-L1 (p) durante 90 min a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 10 min con PBS-T. Se procedió a una segunda incubación con el anticuerpo secundario comercial "Jackson" durante 1 h a temperatura ambiente, y por último se realizaron tres lavados de 10 min con PBS-T y otros tres lavados con agua mili-Q de 10 min también cada uno. Finalmente, se dejaron secar para su posterior tinción.

5.4. Tinción para microscopía electrónica

Todas las muestras visualizadas a microscopía electrónica se tiñeron previamente durante 30 min en acetato de uranilo al 5% (p/v) y en citrato de plomo al 0,3% (p/v) durante un minuto y medio. Entre los dos tratamientos y al final, se lavaron en agua destilada.

Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 a 100kV de tensión de aceleración. Las fotografías tomadas se digitalizaron y fueron procesadas para estudios cuantitativos con los programas de análisis de imágenes: Qwin Standard (Leica Microsystems) e Image J 2.0 (imagejdev.org).

6. CITOMETRÍA DE FLUJO

El material biológico crecido en condiciones experimentales y preservado a -80°C se transfirió a un tubo de cristal con 500 μl del buffer de extracción de núcleos (kit Cystain UV precise P; (Menges y Murray, 2006)). Dependiendo de las características del material se utilizó para su disgregación un homogeneizador "Ultra Turrax" (T25 basic; IKA LABORTECHNIK) o una cuchilla. Posteriormente se pipeteó el extracto que contenía el material disgregado para terminar de romper las paredes celulares y se dejó incubar durante 2 min a temperatura ambiente. Fue filtrado a través de una malla doble de 50 μm , para limpiar la muestra de restos de otros orgánulos y quedarnos únicamente con los núcleos que se habían extraído. Añadimos 1 ml de la solución de marcaje que lleva como agente de tinción fluorescente de DNA el DAPI (kit Cystain UV precise P), lo incubamos durante 2 min a temperatura ambiente y se guardó a 4°C en oscuridad (hasta 12 h después del tratamiento).

Se determinó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular analizando el extracto nuclear con un citómetro de flujo (Cell Sorter FACS Vantage, Becton-Dickinson, San Diego, California). Las muestras se excitaron con un láser a 360 nm y la longitud de onda de recepción fue de 424 nm (excitación de recepción del DAPI). El filtro que utiliza el aparato es 424/44 Ban Pass (BP). El análisis de los resultados de los perfiles del ciclo se hicieron con el programa ModFit LT 3.2 (Verity software house).

7. TÉCNICAS DE GENÓMICA

7.1. Extracción de RNA

Para inactivar cualquier actividad enzimática (principalmente RNAsas) el agua y todos los materiales esterilizables se trataron con dietil pirocarbonato (0,01% (v/v) DEPC: Sigma) durante 12 h seguido de un ciclo de autoclavado a 120°C, antes de ser utilizados para la extracción de RNA.

Se añadieron 0,5 ml de TRIZOL (Sigma) a unos 50 mg de tejido congelado para disociar los tejidos lo suficiente con un homogeneizador estéril. Incubamos 5 min a temperatura ambiente y le añadimos 0,2 ml de cloroformo para que se produzca la separación de las proteínas y los ácidos nucleicos. Se incubó 3 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Se precipitó el RNA añadiendo 0,5 ml de isopropanol a la fase acuosa durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. El pellet de RNA fue lavado con 1ml de etanol al 75% (v/v) y centrifugado a 7500 rpm durante 5 min. El RNA precipitado se resuspendió con agua estéril DEPC y se guardó a -80°C.

El RNA ya resuspendido se purificó con el kit de Quiagen (Rneasy MiniKit; ref. 74104) para la hibridación de *microarrays*. Se estimó su concentración midiendo la absorbancia (relación de absorbancia 260nm / 280nm debe estar entre 1.6 y 2.0), para ello fue utilizado un espectrofotómetro (Nano Drop ND-1000).

7.2. Extracción de DNA

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* de tipo “*wild type*” crecidas durante 4 días a 22°C y con un fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad, se homogenizaron con unos émbolos adecuados en hielo durante 10 s, con 350 µl de tampón de lisis (Tris HCl 10 mM a pH8,0, con NaCl 60 mM y 0,5% (v/v) SDS). Se añadió un volumen de fenol/cloroformo (proporción 1:1) que fue centrifugado a 12000 rpm durante 5 min y se guardó la fase acuosa. Posteriormente fue añadido un volumen de cloroformo y centrifugado en las mismas condiciones. Posteriormente guardamos la fase acuosa, donde están disueltos los ácidos nucleicos y añadimos 1/10 (v/v) volúmenes de acetato

sódico a 3,5 M de pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol. Se mantuvo durante 1 h en hielo y se centrifugó a 12000rpm durante 20 min. Así se obtuvo el DNA precipitado que fue lavado con etanol al 75% (v/v) y centrifugado a 12000rpm durante 5 min. Se dejó secar y resuspendió en agua estéril mili-Q. Se verificó la calidad del DNA midiéndolo en un espectrofotómetro (Nano Drop ND-1000) la relación de absorbancia 260 nm/ 280 nm) y verificamos la integridad del DNA resolviendo una alícuota en una electroforesis en agarosa 1% (debe aparecer una banda con fragmentos de 50-100 Kb y también se suelen observar las bandas características de contaminación de RNAr).

7.3. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) preparativa

Protocolo por reacción de PCR (volumen final 20µl)

- 2 µl DNA genómico (8-10 ng/µl).
- 1 µl dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) a 10 mM.
- 2 µl buffer HF
- 0,5 µl enzima tap HF (Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (F-549).
- 1 µl oligonucleótido (forward) a 10 mM.
- 1 µl oligonucleótido (reverse) a 10 mM.

Protocolo térmico de PCR				
Desnaturalización inicial	Ciclos de PCR (x35)			Elongación final
	Etapa desnaturalización	Etapa hibridación	Etapa elongación	
5 min a 94°C	20 s a 94°	30s a 55°C	30s a 72°C	5 min a 72°C 4°C
		55°C-0,2°C/ciclo (touch-down)	2min 20s a 72°C	

El resultado de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$), donde se pudieron visualizar las bandas de amplificación con una lámpara de luz UV.

Para extraer el DNA recombinante del gel de agarosa se utilizó el kit QIAquick Spin (Quiagen; ref. 28704) y se siguió el protocolo del fabricante sin modificaciones.

7.4. Análisis de expresión génica utilizando “microarrays” de transcriptoma completo

Los RNAs purificados se hibridaron con *microarrays* en el servicio de genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) utilizando chips Agilent de dos colores de *Arabidopsis thaliana* (4x44k), versión 4 (referencia: 021169, Agilent Technologies, Inc. Headquarters). Previamente a la realización de esta técnica se amplificó el RNA para obtener suficiente cantidad de este ácido nucleico para la hibridación. Para el protocolo de amplificación se utilizó el kit de amplificación MessageAmp II aRNA (referencia: AM1751) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA se midió en el nanodrop y la calidad en el Bioanalyzer. La hibridación se produjo siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante (<http://www.home.agilent.com/agilent/>). Las imágenes fueron escaneadas en GenePix 4000B (Axon) y los spots fueron convertidos en datos numéricos usando el programa GenePix (Axon). La corrección y normalización de datos se realizaron con el programa LIMMA. Para obtener una distribución similar y coherente entre las distintas matrices los valores del log-ratio fueron estimados utilizando como estimador la escala de la mediana del valor absoluto. Se utilizó un modelo lineal para determinar los genes de expresión diferencial, para ello, se utilizó el modelo estadístico empírico de Bayes. Para la corrección de falsos positivos se utilizó el método de FDR (*false discovery rate*) de Benjamani y Hochberg (1995). Los niveles de señal obtenidos se analizaron usando programas específicos, como son: FIESTA viewer v.1.0 (Oliveros, 2007) para la obtención de los ratios de señal entre experimentos y control utilizando la significación de p-val (Limma) $< 0,01$ y el FDR (Rank Prod) $< 0,05$. BINGO 2.3 (Maere *et al.*, 2005)

que permitió detectar que grupos ontogénicos están sobrerrepresentados en una colección de genes con diferencias significativas de expresión ($p < 0,05$). El programa GEDI (*Gene Expression Dynamic Inspector* v.2.1; Eichler *et al.*, 2003), que realiza un análisis de *clustering* (de tipo *Self Organizing Map*) con una colección de genes de nuestro interés en función de su patrón de expresión en varias muestras, nos devolvió una imagen con todos estos genes (todos los genes que varían significativa y cuantitativamente al menos en 1 comparación en nuestro caso, $p_{\text{limma}} < 0,05$ y $\log \text{ratio} < \pm 0.5$).

7.5. Análisis de expresión génica por Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa (RT-PCRq)

7.5.1. Tratamiento con DNasa

A partir de RNA purificado como se indico anteriormente fue necesario hacer un tratamiento con DNasa para descartar mínimas contaminaciones de DNA. Se cogieron 2µg de RNA y se trataron con 1µl de DNasa-turbo (Turbo DNA-free; Ambion AM1907) a 37°C durante 1 h. Posteriormente se añadieron 5 µl de resina que viene en el kit de la enzima DNasa y fue incubado durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Una vez que ha precipitado la resina, se recogió el sobrenadante donde estaba disuelto el RNA. Se volvió a centrifugar para eliminar bien los restos de resina y obtener el RNA lo más limpio posible.

7.5.2. Protocolo de RT-PCRq en un solo paso

Esta técnica tiene la ventaja de combinar en un paso la reacción de la transcriptasa inversa, que consiste en pasar de RNA a DNA, y la reacción en cadena de amplificación de la polimerasa. Con este método se puede hacer una cuantificación relativa de la amplificación, permitiéndote comparar entre muestras las diferencias de expresión de una secuencia determinada. La cuantificación relativa se basa en la utilización de un agente intercalante de DNA fluorescente llamado *SYBR green* que permite seguir la amplificación en tiempo real durante la reacción. Se necesita la utilización de primers que posean una alta eficiencia a una concentración determinada

de RNA. Para ello, debemos comprobar esa eficiencia haciendo curvas estándar, que consisten en usar un primer, a una determinada concentración, con diluciones seriadas de RNA (partiendo de una concentración máxima de 70 ng/μl). Se observa su eficiencia para cada rango de concentraciones para elegir la concentración de RNA óptima. Normalmente los oligonucleótidos que son eficientes suelen funcionar bien a concentraciones bajas de RNA entre 10 ng/μl-5 ng/μl.

Protocolo por reacción de PCRq:

- 3 μl RNA (7 ng/μl)
- 7,5 μl de Quantimix Easy SYG kit (kit para amplificación y cuantificación de DNA a tiempo real: Biotools (ref.10609)).
- 0,075 μl de transcriptasa inversa MuLV (Applied Biosystems; N808-0018).
- 0,075 μl de inhibidor de RNAsa (Applied Biosystems; N808-0119).
- 0,9 μl del oligonucleótido (forward) a 5μM.
- 0,9 μl del oligonucleótido (reverse) a 5μM.
- 2,55 μl agua estéril mili-Q.

Protocolo térmico de PCRq (utilizamos el aparato IQ5 Real Time Detection System del servicio de genómica del CIB-CSIC)

- 30 min a 48°C (reacción transcriptasa inversa).
 - 10 min a 95°C (activación de la polimerasa)
 - 10 s a 95°C. Etapa de desnaturalización
 - 20 s a 60°C. Etapa de hibridación primer con el DNA
 - 30 s a 72°C. Etapa de amplificación.
 - 60°C- 95°C (x 36 ciclos de 5 s; subiendo 1°C por cada ciclo) Curva de *melting* para comprobar que el amplicón es único.
- } x40 ciclos

Los resultados fueron analizados y procesados utilizando el programa "*IQ5 Optical System Software*".

8. TÉCNICAS DE PROTEÓMICA

8.1. Extracción de proteínas

La extracción de la fase proteica se llevo a cabo siguiendo el protocolo utilizado por (Barjaktarovic *et al.*, 2007). Se tomaron 0.5 gr de material congelado a -80°C y se le añadió 1 ml de un buffer de lisis que estaba formado por: Tris-HCl a 40 mM (pH 8), antiproteasas (1 µg de aprotinina, pepstatina y leupeptina) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 0,1 mM. Se mantuvo en hielo 30 min (dándole un pulso en el vórtex cada 10 min). Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y se conservó la fase acuosa donde estaban disueltas las proteínas a -20°C ó -80°C hasta su posterior precipitación.

8.2. Precipitación y cuantificación de proteínas

La precipitación y cuantificación de las proteínas, así como los geles bidimensionales de expresión diferencial (DiGE) fueron preparados en el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Los protocolos utilizados se describen a continuación.

Se añadieron al extracto proteico 3 volúmenes de metanol y uno de cloroformo (v/v). Se mezcló con el vórtex y se le añadió 3 volúmenes de agua mili-Q. Se centrifugó durante 5 min a 6000-10000g y posteriormente, se recogió la interfase donde se encontraban las proteínas disueltas. Fueron añadidos otros tres volúmenes de metanol, se mezclaron con el vórtex y se centrifugaron con las mismas condiciones. El resultado que obtuvimos fue la precipitación de la fase proteica; eliminando el sobrenadante con cuidado y dejando secar el pellet al aire.

8.3. Identificación de cambios proteómicos por DiGE (Electroforesis Bidimensional Diferencial Fluorescente) y análisis de péptidos mediante espectrofotometría de masas

Se tomaron 40 µg de las muestras control y de las muestras problema y se marcaron indistintamente con 400 pmol de los ésteres fluorescentes de cianina N-Hidroxisucinimida (Cy3 ó Cy5; CyDryes manufacturer; GE Healthcare) durante 30 min en oscuridad. Todos los experimentos llevan un control estándar para poder comparar distintos geles, que consiste en una mezcla de todas las muestras a la misma concentración; y fue marcado con el marcador Cy2. Los controles, las muestras y el control estándar fueron combinados 2 a 2 para la realización de los geles.

Los extractos proteicos fueron diluidos en un buffer de rehidratación (2x) formado por, 7M urea, 2M thiourea, 4% (v/v) CHAPS, 20mM DTT, 10% (v/v) anfólitos de pH 3-11NL, hasta un volumen final de 100 µl. Este volumen fue aplicado sobre tiras de 24 cm de IPG (gradiente de pH inmovilizado) y con rango lineal de pH 3-11 (GE Healthcare). La primera dimensión se desarrolló en el sistema IPGphor IEF System (GE Healthcare) a 0,05 mA, con un incremento de voltaje que va desde 300V/h en 3h hasta un máximo de 64000 V/h. Después de la primera dimensión las tiras fueron equilibradas en oscuridad en un tampón de equilibrado en SDS (50 mM Tris pH 8,8, 6 M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, con trazas de azul de bromofenol) que contenía 1% (p/v) DTT durante 10 min. Se repitió el proceso en el mismo tampón suplementado con 4% (p/v) de iodoacetamida. Las proteínas se separaron utilizando el equipo Ettan Dalt Six, en geles de 12,5% Tris-glicina y a 20 °C.

Después de la electroforesis los geles fueron escaneados a una resolución de 100µm usando la longitud de onda y los filtros apropiados para revelar la fluorescencia en un escáner Thyphoon 9400 (GE Healthcare). Para su posterior análisis se utilizaron programas específicos para la técnica como son: DeCyder software v7.0, *Differential In-gel Analysis* (DIA), para el análisis de las imágenes y el *Biological Variation Analysis* (BVA) para analizar los resultados. El BVA compara grupos experimentales y considera las diferencias para los distintos spot, teniendo en cuenta el promedio de los ratios para cada spot (fold change $\geq 1,2$ or $\leq -1,2$, se consideran proteínas de interés) utilizando la t de student para localizar diferencias significativas o no entre ambos

grupos ($p < 0,05$). Los spots seleccionados fueron digeridos con tripsina (proteasa) y sometidos a un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF, siguiendo el protocolo que se describe en Maccarrone *et al.* (2010). El resultado que se obtuvo es una serie de espectros de masas (m/z), que se corresponden con los péptidos trípticos característicos de las muestras analizadas. Esas masas y fragmentos fueron enfrentados a una base de datos de proteínas (NCBIInr), que contiene todas las proteínas secuenciadas de disponibilidad pública. Se empleó el buscador *Mascot* donde se compararon las masas triplicas teóricas de todas las proteínas contenidas en la base de datos (acotada a VIRIDIPLANTAE), frente a las masas experimentales obtenidas a partir de nuestras muestras.

8.4. Electroforesis 2D para *Western-blot*

Las proteínas se separaron en la 1ª dimensión utilizando el sistema PROTEAN® IEF System (BIO-RAD) y las tiras de gel de isoelectroenfoque “ReadyStrip IPG” (BIO-RAD) de 7 cm, pH 3-10 NL (no lineal), siguiendo las indicaciones de la firma comercial en el servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas.

Cada tira de gel se sometió a una rehidratación activa con 30 μ g de muestra diluida hasta 140 μ l en solución de muestra 2X (urea 7M, tiourea 2M, 1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio (CHAPS) al 4% (p/v), azul de bromofenol al 0,0003% (p/v)) que contenía ditioneitol (DTT) 18,2 mM y solución de anfólitos “100x Bio-Lyte 3-10 Ampholyte” (BIO-RAD) al 0,5%, cubierto todo ello con aceite mineral, a 50 V / 20°C / 12 h. Posteriormente se aplicaron secuencialmente pasos de isoelectroenfoque desde 250 V/1 h. hasta superar como mínimo los 12.000 V·h totales en todos los casos. La temperatura se mantuvo siempre en 20°C, y el límite de intensidad máxima fue de 50 μ A/gel.

Para el equilibrado de las tiras se incubó cada una en 2 ml de tampón de equilibrado (Tris·HCl 50 mM pH=8,8, urea 6 M, dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% (p/v) y glicerol al 30% (v/v)) que contenía DTT 52 mM durante 15 min y posteriormente se volvió a incubar en 2 ml del mismo tampón que contenía Iodoacetamida 130 mM otros 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavó unos

min cada tira con 2 ml de tampón de electroforesis Tris-glicina (Tris·HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% (p/v)).

Las proteínas se separaron en la 2ª dimensión sometiénolas a SDS-PAGE con una concentración constante de acrilamida del 8% (p/v). Los minigeles se prepararon el día anterior y se conservaron a 4 °C antes de usarlos. Como marcadores de masa molecular se emplearon las mezclas “*Precision Plus Protein™ Standards*” “*Dual Color*” o “*Unstained*” (BIO-RAD), según los casos. Las tiras equilibradas se incluyeron sobre los geles y se llevó a cabo la electroforesis con el tampón Tris-glicina a una potencia de 0,5 W/gel 30 min y 1,5 W/gel hasta que el marcador de MM de 25 kDa llegaba al borde inferior (para resolver mejor nuestras proteínas de interés).

Los geles se tiñeron con SYPRO® Ruby *protein gel stain* (BIO-RAD), siguiendo el protocolo proporcionado por el manual de BIO-RAD. Para la obtención de imágenes de los geles teñidos se utilizó el equipo *EXQuest™ Spot Cutter*, aplicando el programa *PDQuest™ Advanced-8.0.1* (BIO-RAD).

8.5. Inmunodetección de proteínas por 2D-Western-blot

Los geles bidimensionales de proteínas fueron transferidos a una membrana PVDF de 0,20µm previamente humedecida en metanol para hidrofilarla. Se utilizó como soporte de transferencia el sistema de BIO-RAD (modelo Mini-PROTEAN 3 cell) durante 1 h a 100 V.

La membrana con las proteínas se lavaron con PBS-T durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se le añadió una solución de bloqueo (PBS-T con 5% (p/v) de leche desnatada en polvo) y se mantuvo durante 1 h en agitación. Posteriormente se guardó a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se lavó en PBS-T durante 10 min tres veces y se le añadió el anticuerpo primario a la concentración adecuada (ver tabla 1, pagina 49) durante 1h en agitación y a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 10 min con PBS-T y se le añadió el anticuerpo secundario, a una determinada concentración, durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente.

Finalmente la membrana fue lavada muy bien con 3 lavados rápidos con PBST y otros tres lavados de 10 min cada uno. Finalmente se dejó secar en papel secante.

La actividad peroxidasa se reveló por la solución ECL (*ECL Western Blotting Detection*, Amersham, GE Healthcare) durante 1 minuto en oscuridad. Se dejó secar un poco al aire en oscuridad y se expuso sobre una película de revelado de rayos X el tiempo necesario (entre 1 y 10 min normalmente). El tiempo de exposición óptimo depende del tipo de proteína que estemos detectando y de la eficiencia del anticuerpo empleado.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados con el programa estadístico "Statgraphics Plus 5.1". Una vez comprobado que nuestras poblaciones eran normales, con el análisis de Kolmogorov-Smirnov D y con la Chi-cuadrado, hicimos dos tipos de análisis estadísticos dependiendo de la cantidad de muestras a comparar. Para comparar dos muestras entre sí, calculamos la t de Student bilateral con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$) siempre comprobando que nuestras poblaciones eran entre sí homocedásticas (corroborando que no existían diferencias entre las desviaciones típicas calculando una F de Fisher). Para comparar más de dos muestras aplicamos un estudio de varianzas (test de ANOVA, que nos permite comparar todas las muestras a la vez dos a dos) con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), donde las poblaciones también deben ser homocedásticas (test de Bartlett) y la distribución de los residuales debe ser normal.

10. GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS CYCB1:GFPy AtNUC-L1: GFP

Una vez que elegimos y diseñamos los cebadores necesarios para amplificar las secuencias promotoras de nuestros genes de interés (apartado 2.3.) seguimos una serie de procedimientos para generar nuestras construcciones que se resumen en la Figura 25.

A partir de la extracción de DNA genómico obtuvimos por PCR nuestras secuencias promotoras. Estas secuencias fueron clonadas en primer lugar en un vector comercial (p-GEM-T easy) para obtener un mayor número de copias de nuestras secuencias. Posteriormente extrajimos nuestro DNA de interés del vector primario por enzimas de restricción y ligamos en el vector binario, que llevaba ya incorporado el gen fluorescente, GFPm4. Mediante la infección mediada por *A. tumefaciens* conseguimos la inserción de nuestras secuencias promotoras que controlaban la expresión de GFP, en el núcleo de plantas “wt-col0”, mediante inmersión floral, obteniendo semillas transgénicas. Por último seleccionamos las plantas para obtener líneas en homocigosis durante varias generaciones.

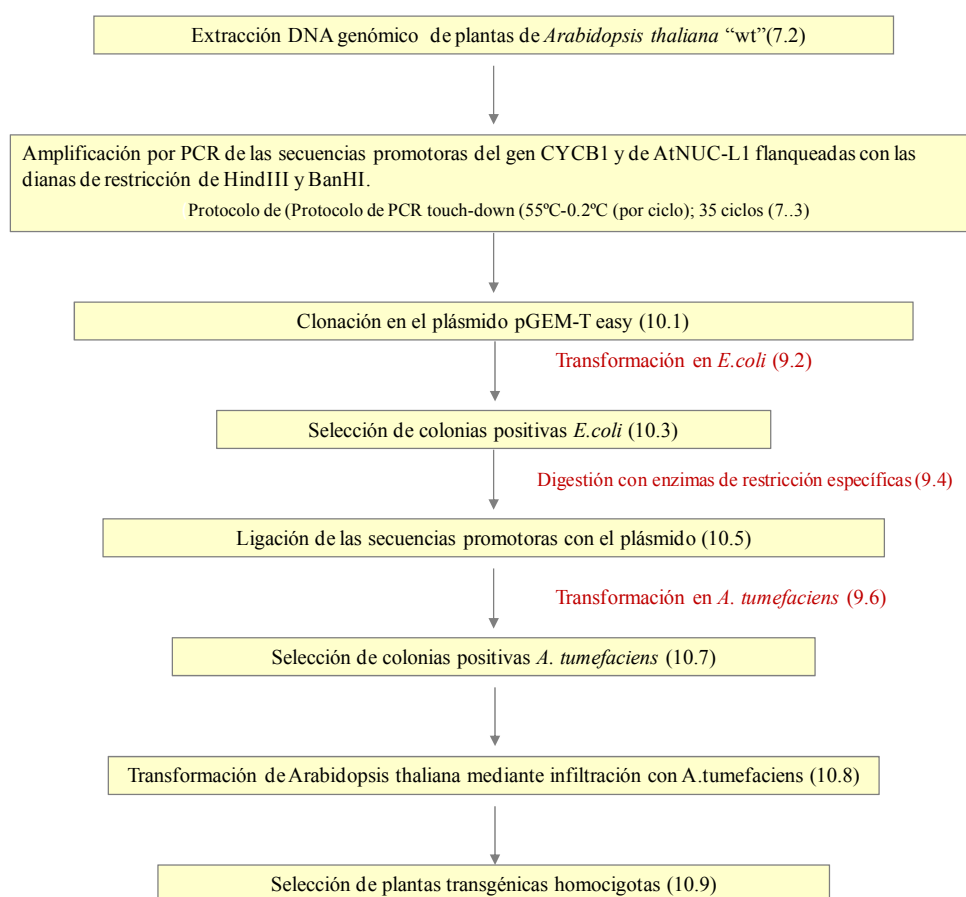


Figura 25. Resumen de la metodología necesaria para la producción y selección de plantas transgénicas. El número de la sección en la que se describe cada protocolo aparece en la figura.

10.1. Ligación en pGEM-T easy

Se añadió para la ligación en el plásmido pGEM-T easy:

- 3 µl de buffer 10x T4 DNA ligasa
- 2 µl de vector pGEM- T easy (Promega A1360)
- 3 µl de T4 DNA ligasa (Promega M1801)
- volumen de DNA purificado para obtener una concentración de 50 ng/µl.

Se completó con agua estéril mili-Q hasta los 30 µl.

Se incubó a 14°C (en la cámara fría) durante 2 días.

10.2. Transformación de células competentes *E. coli*

10.2.1. Preparación de células quimio-competentes de *E. coli*

5 ml de medio LB (Luria-Bertoni, que contiene, 1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura y 1% (p/v) de NaCl, ajustado a pH 7,5 con NaOH) fueron inoculados con la cepa de *E.coli* DH5α. Se incubó durante toda la noche a 37°C y a 220 rpm. Al día siguiente se cogió 1 ml de cultivo y pasó a un matraz que contenía 100 ml LB incubándose a 37°C durante 3 h. Se midió la DO a λ 660 nm hasta obtener un resultado entre 0,4 - 0,6 UO. El cultivo obtenido fue distribuido en tubos de centrifuga de 50 ml y dejó en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm, a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el extracto celular fue resuspendido suavemente en 3,75ml de LB frío. Se dejó en hielo durante 5 min y se le añadió 3,75ml de medio TSS (formado por triptona 0,8% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), PEG (polietilen-glicol) 20% (p/v), 1 volumen de DMSO y otro volumen de MgSO₄; ajustar el pH a 6,5). Se dejó enfriar en hielo durante 5 min y se conservó a -80°C.

10.2.2. Transformación de células quimio-competentes de *E. coli*

Descongelamos una alícuota de células competentes de *E.coli* en hielo, para impedir que las células fueran dañadas. Se les añadió 15µl de la mezcla de ligación obtenida y 15 µl de nuestro plásmido binario, las mantuvimos 30 min en hielo y les dimos un pulso de 90 s a 42°C, produciéndose la entrada del plásmido en las células. Posteriormente fueron mantenidas 2 min en hielo y se les añadió 200 µl LB. El cultivo celular creció durante 45 min a 37°C. Las bacterias fueron plaqueadas en agar al 1,5% (p/v) en medio LB con 1 µl/ml ampicilina (100mgr/ml), 25 µl de IPTG (100mM) y 25 µl de X-gal al 2% (p/v; preparado en Dimetil formamida). Se dejaron incubando toda la noche a 37°C.

10.2.3. Transformación de células electro-competentes de *E. coli*

Descongelamos en hielo una alícuota de células electro-competentes y le añadimos 2 µl de ligación de pGEM-t easy y del plásmido binario. Lo pasamos a una cubeta de electroporación y electroporamos a 2,2 V y 25 µF, en el aparato de *Biorad Pulse Controller* (a una resistividad de 200 Ω y capacidad eléctrica de 125 µF). Se pasó el medio de ligación a un tubo y le añadimos 1 µl LB, incubándose durante 1 h a 37°C. Posteriormente se plaqueó en medio LB (suplementado con 1,5% (p/v) agar) con 1 µl/ml ampicilina (100 mg/ml) y se le añade 25 µl de IPTG (100mM) y 25 µl de X-gal al 2% (p/v; preparado en Dimetil formamida). Se dejó unos min absorbiendo y se incubó toda la noche a 37°C.

10.3. Selección de colonias positivas de *E. coli*

Por un lado, las colonias que no incorporan el plásmido mueren por no tener resistencia a Ampicilina. Por otro, las colonias azules han incorporado el plásmido sin inserto, y por ello el gen de la β-galactosidasa, está intacto y reacciona con X-gal produciendo el precipitado coloreado. Finalmente, las colonias blancas tienen el gen β-galactosidasa interrumpido por nuestro inserto, por lo tanto estas son las cepas que nos interesan. Se comprobó por PCR (protocolo descrito en el apartado 7.3) que realmente

las colonias blancas eran positivas y una vez que lo corroboramos pusimos un cultivo en LB (para obtener mayor cantidad de réplicas del plásmido) a 37°C toda la noche. Al día siguiente se realizó una extracción del plásmido utilizando el protocolo del kit específico de Roche Applied Science (*High Pure Plasmid Isolation* kit; ref: 11754777001).

10.4. Digestión con enzimas de restricción específicas

Los plásmidos aislados de pGEMT-easy con nuestro inserto y el vector binario pBIN 35S-mGFP4 fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción, como se describe a continuación:

- 1ª digestión con HindIII:

A partir de 4µg de plásmido se le añadió:

- 6 µl buffer enzima 2 (10x)
- 1 µl enzima HindIII (Invitrogen).
- Añadir agua estéril mili-Q hasta un volumen final de 60µl. Incubar durante 2h a 37°C.

- 2ª digestión con BamHI:

A la digestión anterior se le añade 3 µl de NaCl (1M) para corregir la salinidad que requiere BamHI. Finalmente añadimos 1 µl de dicha enzima (BamHI; Invitrogen). Se incuba 2 h a 37°C.

Se purificó el plasmido pBIN y el inserto independientemente tras resolver ambos fragmentos en un gel de agarosa al 0,6%.

10.5. Ligación de las secuencias promotoras con el plásmido binario

Se incubaron 50 ng del plásmido binario digerido con 13 ng de nuestras secuencias promotoras aisladas con DNA ligasa (Promega M1801) como se indica en el apartado 10.1. para obtener las construcciones pCYCB1:mGFP4 y pNUCL1:mGFP4.

Como paso previo a la transformación menos eficiente en *A. tumefaciens*, se transformaron células competes de *E.coli* DH5 α con las ligaciones obtenidas (seguir el paso 10.2.2), para obtener la mayor cantidad de copias de los nuevos plásmidos y se seleccionaron colonias positivas según el punto 10.3. Las regiones de ligación e inserto de estos plásmidos fueron secuenciadas (servicio de secuenciación en el CIB; empresa SECUGEN) para estar completamente seguros que el plásmido había incorporado nuestras secuencias específicas enteras y sin mutaciones. Además todas las colonias fueron chequeas por PCR (apartado 7.3) y análisis de restricción (apartado 10.4), excepto en caso de las colonias que llevan la construcción pBIN CYCB1-mGFP4, no se pudo chequear por PCR al perderse el oligonucleótido (*forward*) al digerir con HindIII.

10.6. Transformación en *Agrobacterium tumefaciens*

10.6.1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*

Se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* C58C1 para hacer células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*. Se cogió una colonia de la cepa elegida y se le añadió 10ml de medio líquido LB, se incubó una noche a 28°C agitación a 210 rpm. Al día siguiente se inocularon los 10 ml en un matraz con 100 ml de LB y se dejó crecer hasta alcanzar una D.O. (λ 600nm) de 0,5 UO. A partir de este momento todo se hizo a 4°C. Una vez que el cultivo había alcanzado la D.O. deseada se centrifugo a 5000 rpm durante 5 min. Se resuspendieron las células con 2 ml Cl₂Ca (20mM) frío y estéril, se hicieron alícuotas y se congelaron inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenaron a -80°C.

10.6.2. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*

Se añadió 1 μ g de DNA a una alícuota (200 μ l) de células competentes sin descongelar y se mantuvo a 37°C durante 5 min y en hielo 30 min. Posteriormente se le añadió 1ml LB y se dejó en agitación a 210 rpm, de 2-4 h. Por último se añadió este volumen a placas de LB con kanamicina (100 μ g/ml), con el objetivo de seleccionar mediante el gen de resistencia que lleva incorporado nuestro plásmido y rifampicina (50 μ g/ml), gen de resistencia endógeno de *A. tumefaciens*. Crecieron durante 4 ó 5 días a 28°C.

10.7. Selección de colonias positivas de *A. tumefaciens*

Las colonias que crecieron en el medio debían ser colonias positivas todas ellas, debido a que el medio lleva dos antibióticos selectivos, uno específico del plásmido con el que hemos transformado y otro endógeno de *A. tumefaciens*. Comprobamos que todas llevan nuestro plásmido por PCR (protocolo descrito en el apartado 7.3) y para ello diseñamos dos oligonucleótidos nuevos, uno para la *ciclina B1*, ya que habíamos perdido la secuencia con la que amplificaba nuestro primer CYCB1; 1:GFP(for; por pertenecer a la secuencia de DNA anterior a la diana HindIII) y otro específico de la región codificante de la GFP, para estar seguros de que seguía llevando el gen fluorescente detrás. Para la PCR utilizamos los cebadores: CYCB1;1:GFP(for2), Nuc-L1 (for) y mGFP4 (rev).

10.8. Transformación de *A.thaliana* mediante infiltración con *A.tumefaciens*

Dos días antes de la infiltración se inoculó el clon seleccionado de *Agrobacterium* en 10 ml LB con kanamicina (50 µg/ml) y se dejó crecer a 28°C, en agitación a 210 rpm durante 24 h. Este preinóculo se llevó a 500 ml de LB con kanamicina y se mantuvo creciendo durante 24 h a 28°C y en agitación 210 rpm. Cuando el cultivo alcanzó a la D.O. ($\lambda 600\text{nm}$) de 2 UO, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Se resuspendieron las bacterias en 200 ml de medio de infiltración, que estaba formado por 0,235% (p/v) Murashige y Skoog (incluye vitaminas y MES; Duchefa Biochemies; referencia:MO255.0010), 5% (p/v) sacarosa y agua estéril mili-Q hasta alcanzar el volumen deseado. Ajustar el pH a 5,7 con KOH (1M). Justo antes de infiltrar, añadimos 10 µl del surfactante SILWET (Arysta Lifescience) por cultivo. La infiltración consistió en poner boca abajo una maceta de *Arabidopsis thaliana* en floración, sobre un recipiente donde está el medio de infiltración durante 5 min y después las plantas fueron tapadas con una bolsa de plástico y conservadas en oscuridad en posición horizontal durante una noche. Al día siguiente se eliminó la bolsa y se colocaron las macetas en el incubador donde habían estado creciendo hasta entonces.

10.9. Selección de plantas transgénicas homocigotas

Las plantas infiltradas se dejaron crecer hasta que dieron semillas. La planta entera se dejó secar durante un mes, posteriormente se extrajeron las semillas del interior de las silicuas y se dejaron secar unas semanas más. Las semillas fueron seleccionadas en placa de agar con medio Murashige y Skoog (descrito en el apartado 1.1) suplementado con kanamicina (50 µg/ml) para seleccionar las plántulas que llevaban el inserto (resistentes al antibiótico). Se trasplantaron a tierra y a las dos semanas se cogió un poco de tejido para corroborar por PCR (protocolo descrito en el apartado 7.3) que realmente llevaban la construcción que nos interesa y estudiamos de nuevo su descendencia. Buscamos plantas que llevaran un solo inserto y por lo tanto que fueran heterocigotas, es decir que tuvieran una descendencia resistente a kanamicina en proporción $\frac{3}{4}$ $\frac{1}{4}$. Las semillas de las plantas heterocigotas fueron sembradas, para localizar cuales de sus descendientes seran homocigotos, lo que significa que la línea está establecida y toda su descendencia heredará el plásmido con la GFP.

11. DISEÑO DE EXPERIMENTOS REALIZADOS EN DIFERENTES INSTALACIONES GBF (*Ground Based Facilities*; Instalaciones de Simulación de Microgravedad en Tierra) EUROPEAS

11.1. Experimentos en el levitador magnético (Nottingham, Reino Unido)

11.1.1. Diseño experimental con la línea transgénica *CYCB1:uidA*

Las semillas de la línea transgénica *CYCB1:uidA*, fueron esterilizadas en Madrid y sembradas en tubos específicos para el Levitador (25 mm de diámetro x 55 mm) que contenían 5 ml de medio de cultivo, en Nottingham (UK). Se vernalizaron a 4°C durante 48 h en oscuridad. Posteriormente se introdujeron en el Levitador magnético en las distintas posiciones de gravedad efectiva, 0g*, 1g* y 2g* y se sometieron al campo magnético de 16,5 T, durante 2 y 4 días de crecimiento, a 22°C y en oscuridad. A la vez se llevo a cabo una muestra control 1g fuera del campo magnético y en las mismas condiciones de crecimiento.

Las plántulas crecidas en cada una de las condiciones de gravedad efectiva se separaron en tres grupos para llevarse a cabo tres métodos diferentes de estudio: uno de microscopía óptica, la actividad de la β -glucuronidasa, donde se cogió un tercio de plántulas crecidas en las diferentes posiciones y se les añadió acetona al 90% (v/v). Se mantuvieron toda la noche a -20°C . Al día siguiente las muestras volvieron a Madrid, se lavaron con buffer fosfato 100 mM y se incubó toda la noche en la reacción enzimática durante 16 h. Se continuó con el protocolo descrito en el apartado 4.1.

El resto de las muestras se utilizaron para microscopía electrónica de transmisión. La mitad de las plántulas fueron procesadas por el método convencional de fijación, para estudios de inmunocitoquímica, y la otra mitad por el protocolo de metilación-acetilación, para estudiar exclusivamente la ultraestructura del nucleolo. Ambos protocolos se hicieron como se describen en los apartados 5.1.1 y 5.1.2, hasta llegar al paso de deshidratación 70% (v/v), donde se dejaron toda la noche a 4°C y al día siguiente fueron transportados a Madrid donde se continuó con los protocolos descritos en sus apartados correspondientes. Posteriormente se llevó a cabo el corte y tallado de las muestras para estudios: morfométricos, inmunocitoquímicos y ultraestructurales, siguiendo los protocolos descritos en el apartado 5.

11.1.2. Diseño experimental con la línea transgénica *CYCBI:uidA* crecida con mayor concentración de sacarosa en el medio de cultivo

Semillas de la línea transgénica *CYCBI:uidA*, se esterilizaron en Madrid y se sembraron en los tubos específicos del Levitador magnético en Nottingham, (UK). Los tubos contenían previamente 5 ml de un medio de cultivo adecuado para las plantas descrito en el apartado 1.1., pero suplementado con una concentración de sacarosa (30g/l) mayor de lo habitual. Se vernalizaron a 4°C durante 48 h en oscuridad. Posteriormente se introdujeron en el aparato en las distintas posiciones de gravedad efectiva, $0g^*$, $1g^*$ y $2g^*$ y se sometieron al campo magnético de 16,5 T, durante 2 y 4 días de crecimiento, a 22°C y en oscuridad. A la vez se llevo a cabo una muestra control $1g$ fuera del campo magnético y en las mismas condiciones de crecimiento.

Las plántulas crecidas para los distintos tiempos respectivamente, fueron procesadas para estudios cuantitativos de la actividad β -glucuronidasa descritos en el apartado anterior y para estudios morfométricos. Para ello la mitad de las muestras fueron fijadas con acetona al 90% (v/v) y conservadas a -20°C hasta la vuelta a Madrid al día siguiente. Se lavaron con tampón fosfato y fueron sometidas a la reacción específica de la actividad β -glucuronidasa durante 12 h, continuándose con el protocolo descrito en el apartado 4.1. Las muestras destinadas a estudios morfométricos fueron fijadas con glutaraldehído al 3% diluido en PBS durante 1 h, a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS durante 10 min y se procedió a deshidratar con metanoles al 30% (v/v) y 50% (v/v) durante 30 min respectivamente y se dejó en metanol al 70% (v/v) durante toda la noche a 4°C . Al llegar a Madrid se continuó con el protocolo descrito para metilación-acetilación (5.1.2). Se realizaron cortes semifinos de $2\mu\text{m}$ de espesor para estudios morfométricos, como se describe en el apartado 5.2.

11.1.3. Diseño experimental con la línea transgénica *DR5:uidA*

Semillas de la línea transgénica *DR5:uidA* fueron esterilizadas en Madrid, sembradas en los tubos del Levitador magnético (Nottigham, UK) y vernalizadas a 4°C durante dos días. Las plántulas crecieron durante 4 días a 22°C y en oscuridad. A la vez se llevo a cabo el crecimiento de una muestra control en las mismas condiciones, no viéndose afectada el campo magnético. Las muestras se fijaron en acetona al 70% (v/v) y permanecieron a -20°C durante unas horas. Nos enviaron las muestras en hielo seco por mensajería y al día siguiente llegaron a Madrid. Las plántulas estuvieron fijándose durante 28 h en acetona al 70% (v/v), posteriormente se siguió con el protocolo de la actividad β -glucuronidasa (apartado 4.1), lavándose con tampón fosfato y sometida a la reacción enzimática durante 16 h. El estudio de los resultados de la actividad β -glucuronidasa se hicieron como se describe en el apartado 4.1.

11.2. Experimentos en la Centrifuga de Gran Diámetro (LDC; Noordwijk, Holanda)

11.2.1. Diseño experimental con la línea transgénica *CYCB1:uidA* y la línea silvestre

Semillas de las líneas WT y *CYCB1:uidA* fueron esterilizadas y sembradas en ESTEC en placas de cultivo (90mm) que contenían 10 ml de medio de cultivo, se dejaron vernalizar durante 48 h y se introdujeron en el interior de la Centrifuga. Se realizaron dos experimentos sometidos a diferente gravedad efectiva, uno a 2g y otro a 6g; en ambos se crecieron las plántulas durante 2 y 4 días a 22°C y en oscuridad. Se hicieron dos tipos de controles: un control mecánico, es decir, que no estaba sometido a la hipergravedad, pero sí a la vibración, como la muestra experimental, y un control que no se veía afectado ni por la fuerza gravitatoria, ni por la vibración.

La mitad de las plántulas de la línea *CYCB1:uidA* fueron procesadas para la actividad β -glucuronidasa, fijándose en acetona 90% (v/v) durante toda la noche hasta la llegada a Madrid al día siguiente. Posteriormente se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.1., manteniéndose en la reacción enzimática durante 19 h para el experimento sometido a 2g y durante 22 h para el 6g. El estudio de los resultados de la actividad β -glucuronidasa se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.1. El resto de muestras fueron fijadas con gluraldehído al 3% (v/v) diluido en PBS durante 1 h, a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS durante 10 min y se procedió a deshidratar con metanoles al 30% (v/v) y 50% (v/v) durante 30 min respectivamente y se dejó en metanol al 70% (v/v) durante toda la noche a 4°C. Al llegar a Madrid se continuó con el protocolo descrito para metilación-acetilación (5.1.2). Las muestras se procesaron para estudios morfométricos y ultraestructurales a microscopía electrónica, para lo cual se siguieron los protocolos descritos en el apartado 5.

La línea WT únicamente se utilizó para estudios morfométricos y ultraestructurales como los descritos en el párrafo anterior.

11.3. Experimento en la RPM (“Random Positioning Machine”) y en la Centrifuga (LDC; Noordwijk, Holanda)

11.3.1. Diseño experimental con la línea transgénica DR5:uidA

De manera simultánea se hicieron dos experimentos iguales con la línea transgénica *DR5:uidA* para el estudio de la expresión del promotor acoplado al gen reportero “GUS” en dos simuladores diferentes, la RPM y la LDC a 2g.

Las semillas fueron esterilizadas en Madrid y sembradas en placa en ESTEC, donde se encuentran los aparatos de simulación de gravedad alterada. Las plántulas crecieron durante 4 días a 22°C y en oscuridad. A la vez se crecieron experimentos controles, uno en el marco de la RPM en las mismas condiciones pero sin verse afectado por la microgravedad efectiva y otro control en el motor de la centrifuga, que se veía sometido a la vibración pero no al aumento de la fuerza gravitatoria. Las plántulas fueron fijadas como indica el protocolo descrito en el apartado 4.1, con acetona 90% (v/v), y sometidas a la reacción enzimática durante 16h. El estudio de los resultados de la actividad β -glucuronidasa se realizó como se describe en el apartado 4.1

11.4. Experimento en los simuladores: RPM, centrifuga (LDC) y levitador magnético (Nijmegen) con callos vegetales de *Arabidopsis thaliana*

A partir del mismo cultivo celular de *Arabidopsis thaliana* se indujo la formación de callos en placa (90 mm) y en tubos (25 mm de diámetro x 41mm), a diferentes días. Los callos crecieron a 22°C y en oscuridad. Se transportaron a Holanda donde se encontraban los diferentes simuladores (RPM, LDC y el Levitador) a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron simultáneamente tres experimentos iguales en los distintos aparatos de simulación de la gravedad a lo largo de una semana. Los callos con 7 días de crecimiento fueron introducidos en los diferentes simuladores y se expusieron a las distintas condiciones durante 3 h y 20 min, a 22°C y en oscuridad.

En el caso del Levitador se realizaron tres rondas de experimentos en las mismas condiciones, debido a la poca cantidad de material que se podía introducir para cada posición en los tubos específicos del Levitador. Se introdujeron los tubos en las 5

posiciones diferentes, y además, se hizo una muestra control, que no se veía influenciada por el campo magnético. El material obtenido en cada ronda se dividió en diferentes alícuotas de 500 mg, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para los análisis posteriores. En los otros simuladores se hizo una única ronda de experimentos con cuatro placas de material por cada uno, dos placas sometidas gravedad simulada y las otras dos como controles experimentales (un control colocado en el marco de la RPM, sin verse afectado por la microgravedad efectiva y otro control en el motor de la Centrífuga, sometido a la vibración rotacional pero no al aumento de la fuerza gravitatoria). De la misma forma que en el caso anterior, también se dividió el material en alícuotas de 500 mg, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C , para los estudios posteriores.

En todos los casos se cogió una pequeña alícuota de cada experimento, para estudios morfométricos y ultraestructurales. Se fijaron las muestras con glutaraldehído al 3% (v/v) diluido en PBS durante 5 días a 4°C hasta que llegaron a Madrid. Posteriormente se continuó con el protocolo de metilación-acetilación (apartado 5.1.2)

Con las alícuotas congeladas se emplearon en diferentes técnicas, utilizándose tres réplicas por cada tipo de muestra. En el caso del Levitador una alícuota por ronda. En la RPM y LDC, se utilizaron una alícuota de cada placa y la otra fue elegida al azar de una de las dos placas. Las muestras se distribuyeron para:

- Citometría de flujo (protocolo descrito en el apartado 6).
- Análisis genómicos (protocolos en el apartado 7). Extracción de RNA. Análisis de expresión génica y comparación entre muestras por la técnica de *microarrays*. Análisis diferenciales de expresión de genes específicos por RT-PCRq.
- Análisis proteómicos (protocolos descritos en el apartado 8). Extracción de proteínas. Análisis y comparación de expresión entre muestras mediante la técnica de geles bidimensionales diferenciales (DiGE). Comparación de la expresión de proteínas específicas por *Western-blot*, a partir de geles bidimensionales. En el caso de los *Western-blot*, se analizó una única réplica. De cada muestra se hicieron tres geles bidimensionales uno para teñir otros dos destinados para *Western-blot* con dos anticuerpos anti-nucleolina.

RESULTADOS

*PRIMERA PARTE: Estudio sistemático del estado proliferativo y el crecimiento celular de células meristemáticas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a diferentes simuladores de gravedad alterada*

- 1. Estudios de proliferación y crecimiento celular con la línea transgénica *CYCB1:uidA* sometida a diferentes condiciones gravitatorias en el levitador magnético (Nottingham, UK) en medio de cultivo estándar**
- 2. Estudio de la línea transgénica *CYCB1:uidA*, en la Centrifuga de Gran Diámetro (LDC) (Holanda, ESA-ESTEC)**
- 3. Estudios de proliferación y crecimiento celular con la línea *CYCB1:uidA* sometida a diferentes condiciones gravitatorias en el levitador magnético (UK) en un medio de cultivo suplementado con una mayor cantidad de sacarosa**
- 4. Estudio sistemático de la distribución de auxinas con la línea transgénica *DR5:uidA* en todos los simuladores de gravedad alterada utilizados**

RESULTADOS

Primera Parte: Estudio sistemático del estado proliferativo y el crecimiento celular de células meristemáticas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a diferentes simuladores de gravedad alterada

1. Estudios de proliferación y crecimiento celular con la línea transgénica *CYCB1:uidA* sometida a diferentes condiciones gravitatorias en el levitador magnético (Nottingham, UK) en medio de cultivo estándar

Con el objetivo de complementar los estudios previos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en microgravedad real (ISS) y simulada (RPM; (Matía *et al.*, 2007; 2010)) y de explorar nuevas vías de estudio en instalaciones terrestres de los efectos de la gravedad alterada, se realizó un experimento secuencial a 2 y 4 días de crecimiento, contando el tiempo desde la hidratación de las semillas (ver detalle del diseño experimental en la Figura 26) con la línea transgénica *CYCB1:uidA*, en el interior del Levitador magnético. La línea transgénica utilizada alberga un gen reportero (GUS) que permite estimar con gran fiabilidad la expresión del gen de la ciclina B1, un importante regulador del ciclo celular, específicamente de la transición G2/M (Criqui *et al.*, 2000), mediante la reacción histoquímica de la β -glucuronidasa, que se realiza *in situ* y se observa a microscopía óptica. Por otra parte, el comportamiento de esta línea transgénica es en todo igual al del genotipo silvestre.

La germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas se llevaron a cabo en oscuridad, por coherencia con los experimentos previos mencionados más arriba.

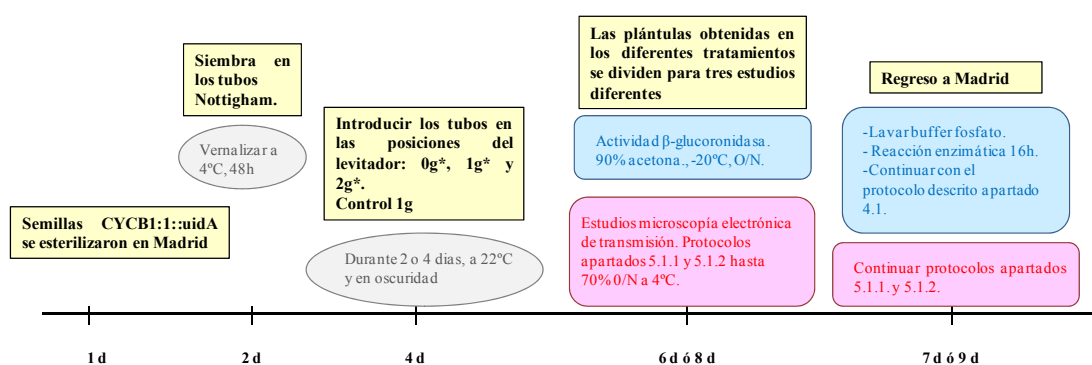


Figura 26. Diseño experimental con la línea transgénica *CYCB1:1::uidA* en el Levitador magnético (Nottingham)

El uso del Levitador magnético nos permitió observar simultáneamente varias condiciones de gravedad alterada diferentes (0g* y 2g*) y corroborar el efecto de la microgravedad e hipergravedad al mismo tiempo. La simulación de la alteración de la gravedad basada en el principio de la levitación magnética del agua, debida a sus propiedades diamagnéticas, presenta la ventaja de que está libre de fuerzas inerciales que pueden perturbar el sistema, como es el caso de los dispositivos basados en la rotación (Random Positioning Machine y Centrífuga), pero la interpretación de los datos se complica con la existencia de un alto campo magnético que actúa sobre las muestras. De todas formas, la existencia de una posición interna al Levitador magnético en la que se pueden exponer las muestras sin alteración de la gravedad, pero sometidas al campo magnético (1g*) es un control interno de extraordinaria utilidad.

Los parámetros que se midieron para estudiar la proliferación y el crecimiento celular, fueron los siguientes:

a) Parámetros relacionados con la Proliferación Celular:

- Longitud de la plántula entera y de la raíz.
- Tinción histoquímica de β -glucuronidasa (expresión de ciclina B1).
- Medidas morfométricas para cuantificar el número de células por milímetro en las filas de células del meristemo de la raíz y la anchura del meristemo.

b) Parámetros relacionados con el Crecimiento Celular:

- Medidas morfométricas para cuantificar el área de los nucleolos.
- Análisis ultraestructural del nucleolo e inmunolocalización cuantitativa de nucleolina a microscopía electrónica.

1.1. Posición de las plántulas en los tubos

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (transformadas con la construcción *CYCB1:uidA*) se colocaron en tubos que contenían agar con medio de cultivo, dispuestas para germinar. Los tubos que se utilizaron estaban especialmente adaptados para su inserción en el interior del Levitador magnético, en las posiciones correspondientes previamente calibradas en las que el campo magnético producía una gravedad defectiva de $0g^*$, $1g^*$ y $2g^*$, de acuerdo con las propiedades diamagnéticas del agua. Dentro de cada tubo se realizó una calibración de la gravedad efectiva y las semillas se colocaron, precisamente en la posición coincidente con el valor de g^* al que se pretendía someter a las muestras (ver Figura 27 para la posición $0g^*$).

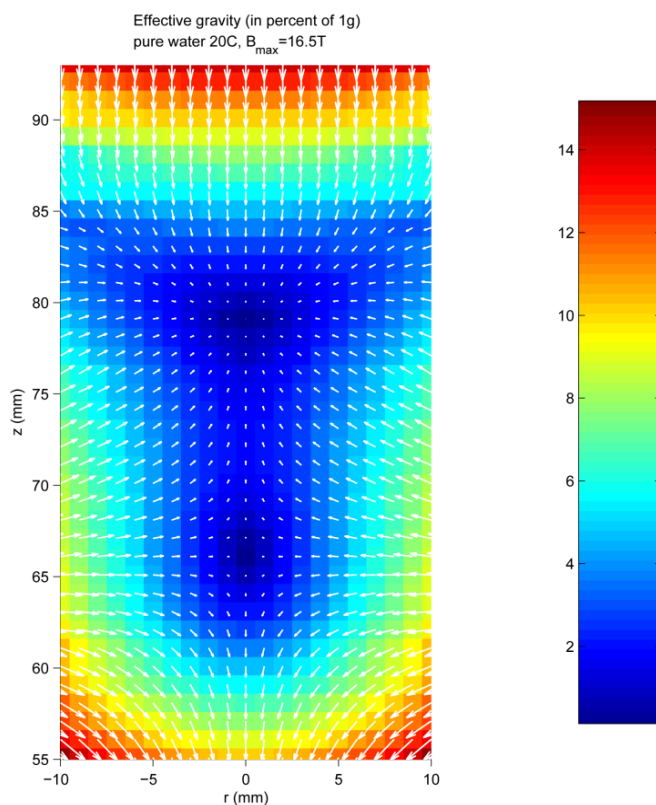


Figura 27. Diagrama de la gravedad efectiva en el interior del tubo insertado en el Levitador magnético en la posición correspondiente a $0g^*$. Se muestra mediante un código de colores la gravedad efectiva en cada punto, según las propiedades diamagnéticas del agua. Las semillas se colocaron en la zona entre los 80 y 85 mm, en la que la gravedad efectiva es menor que el 2% de g.

Las plántulas que crecieron en el interior del Levitador Magnético para los distintos tratamientos, $0g^*$, $1g^*$ y $2g^*$, durante 2 y 4 días a 22°C y en oscuridad, no muestran diferencias en la orientación del crecimiento, es decir, que el crecimiento de la raíz se produce en la dirección del vector gravitatorio en todos los casos. Por lo tanto y sorprendentemente no se pierde el gravitropismo en las muestras crecidas a $0g^*$ (Figura 28), a diferencia de lo que ocurre en microgravedad real o simulada en la RPM.

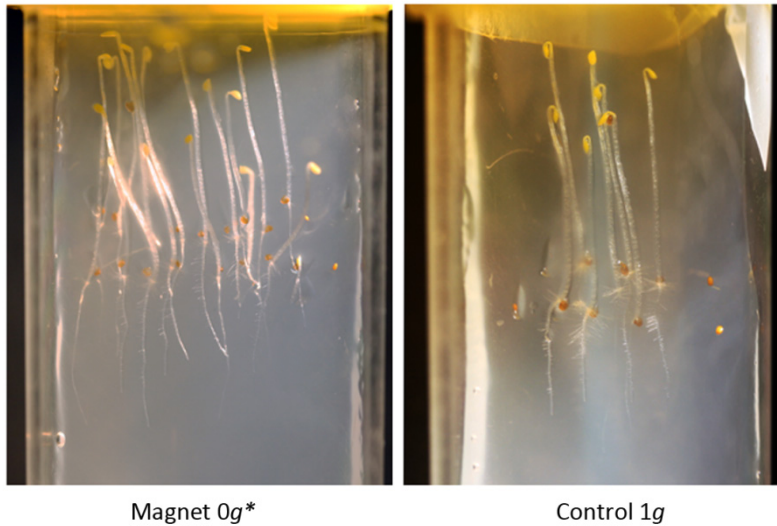
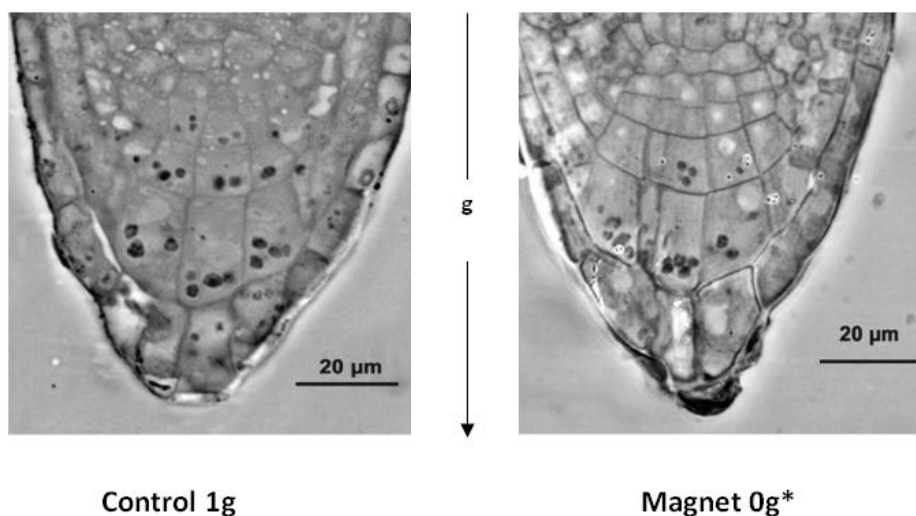


Figura 28. Plántulas crecidas 4 días dentro del levitador magnético. Se observa que en ambas muestras (fuerza gravitatoria efectiva $0g^*$ o control externo $1g$) no hay diferencias en la orientación del crecimiento de la raíz. No se pierde el gravitropismo en $0g^*$.

Para averiguar por qué las plántulas crecidas a $0g^*$ no pierden el gravitropismo observamos por microscopía óptica en contraste de fases y por microscopía electrónica las células de la punta de la raíz (columela), especializadas en la recepción del estímulo gravitacional que genera el proceso gravitrópico (Figura 29). Los estatolitos (amiloplastos) de las células de la columela (estatocitos) presentan la misma posición, tanto en la muestra control $1g$ como en la muestra $0g^*$. Todos los estatolitos están situados en la parte basal de la célula, es decir, están polarizados siguiendo la misma dirección que el vector gravedad. La razón es que el campo magnético no es capaz de levitar los gránulos de almidón del interior de los estatocitos, por lo que estas células no detectan la compensación de fuerzas que simula la microgravedad y, consiguientemente, no modifican su gravitropismo. Sin embargo, el agua intracelular sí responde al campo magnético, de acuerdo con sus propiedades diamagnéticas, lo cual afecta a las sustancias contenidas en el agua y a las que interaccionan con el agua, lo que significa que el interior celular está sometido a levitación.

A) Microscopía óptica



B) Microscopía electrónica de transmisión

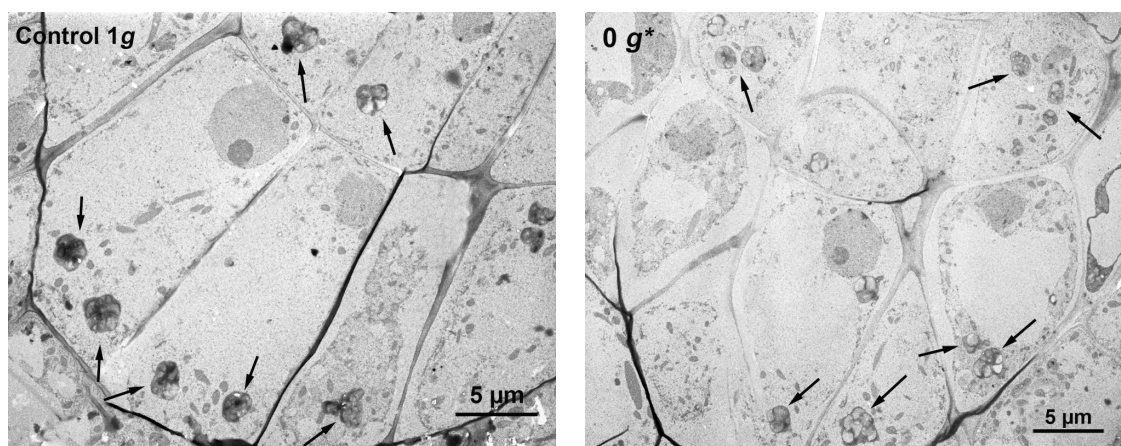


Figura 29. Meristemos radiculares crecidos durante 4 días fuera y dentro del levitador magnético (0g*).

A) Microscopía óptica de contraste de fase. Se muestran los estatolitos, que aparecen como cuerpos densos en el interior de las células de la columela. En la muestra 0g* presentan la misma posición basal que los de la muestra control 1g, por lo que en ambos casos están polarizados en la misma dirección, promoviendo el crecimiento de la raíz según el vector gravedad. B) Microscopía electrónica de células de la columela. Se confirma que los estatolitos (flechas) tienen la misma posición basal en las muestras en microgravedad simulada (0g*) y en el control (1g).

1.2. Longitud de las plántulas

La longitud de las plántulas es una estimación de cómo el crecimiento y la proliferación de las células se manifiestan en el desarrollo de la planta a nivel global. Se midió la longitud de las plántulas para los diferentes tratamientos, 0g*, 1g*, 2g* y control 1g. A los dos días de crecimiento las plántulas crecidas bajo la influencia del campo magnético, pero sin modificar la fuerza gravitatoria efectiva (1g*), no eran más

largas que las del control 1g. Las plántulas crecidas en microgravedad simulada ($0g^*$) eran significativamente ($p < 0,05$) más cortas que las del control 1g y las del control interno 1g* (Figura 30 y 31). Sin embargo, en hipergravedad simulada ($2g^*$) el crecimiento fue mayor al compararse con los controles. Para el caso de plántulas de 4 días se observó un aumento significativo de longitud en todas las plántulas sometidas al campo magnético frente al control 1g (Figura 30 y 31). En este caso, los datos más llamativos son la existencia de diferencias entre el control externo (1g) y el control interno ($1g^*$), sometido al campo magnético, y el comportamiento opuesto de la muestra $0g^*$ respecto al control, en relación con el observado a los dos días.

A) Plántulas a los 2 días de crecimiento



Figura 30. Morfología de las plántulas en diferentes condiciones de gravedad alterada y tiempos de crecimiento.
A) Dos días; B) Cuatro días.

B) Plántulas a los 4 días de crecimiento



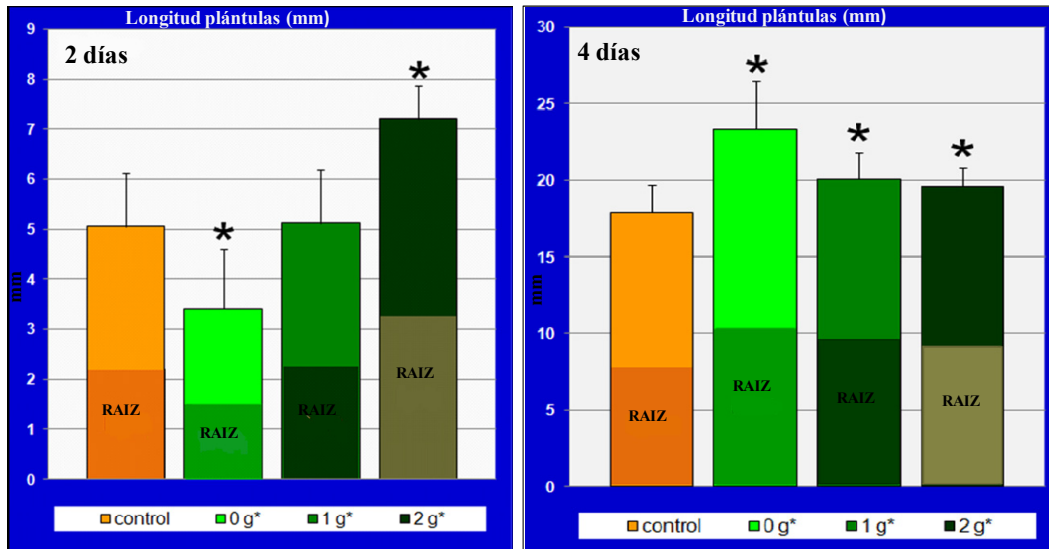


Figura 31. Longitud media (mm) ± desviación estándar de las muestras crecidas dentro y fuera del Levitador Magnético. Comparamos todas las condiciones experimentales con el control 1g. Se produce una disminución de la longitud de plántulas crecidas durante 2 días en el tratamiento 0g* y un aumento para la condición 2g*. Existen diferencias significativas en la longitud en todos los casos cuando crecemos durante 4 días en el interior del Levitador aunque el cambio es cuantitativamente menor. Existen diferencias significativas al comparar el control interno 1g* con microgravedad simulada e hipergravedad, sólo a 2 días de crecimiento, aunque no se muestra el nivel de significación en la figura. Se representa la longitud de la raíz en proporción a la longitud total de la plántula. ($p < 0,05$; se representa con un *).

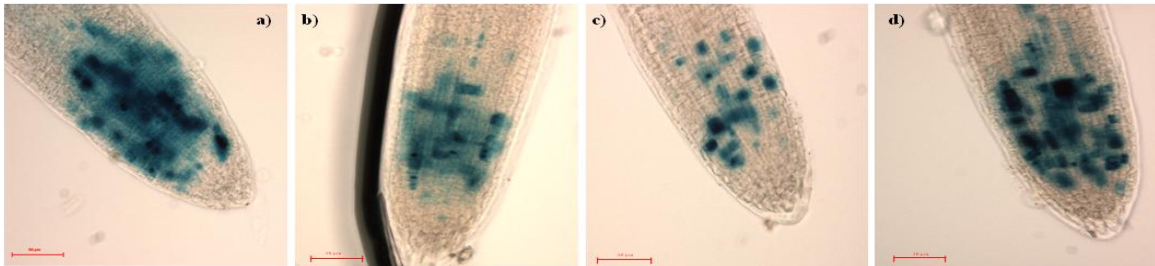
1.3. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

Para detectar la expresión del gen de la ciclina B1 (*CYCBI; 1*), se ha utilizado el método indirecto basado en medir la actividad β -glucuronidasa en plantas portadoras de esta construcción transgénica. Tras la tinción, cuantificamos la densidad óptica integrada en el meristemo radicular sobre imágenes obtenidas a microscopía óptica en campo claro (como se ha descrito anteriormente en el apartado 4.1).

En primer lugar observamos que el campo magnético afecta a la expresión del gen *CYCBI; 1*, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el control 1g, crecido fuera del aparato, y el control 1g* crecido bajo el efecto del campo magnético, tanto a los 2 como a los 4 días de crecimiento (Figuras 32 y 33). La expresión de la ciclina B1 (*CYCBI; 1*) sufre un fuerte decremento cuando se dobla la gravedad terrestre (2g*) a los 4 días de crecimiento, aunque este efecto todavía no es apreciable a 2 días, siendo la expresión similar al control 1g. En condiciones de microgravedad simulada efectiva (0g*), tanto a los 2 como a los 4 días de crecimiento se

Plántulas de 2 días de crecimiento

A) Localización in situ



B) Cuantificación D.O. I

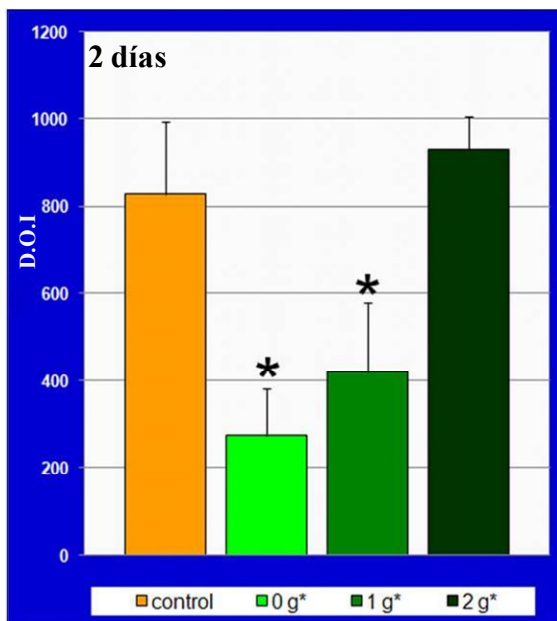
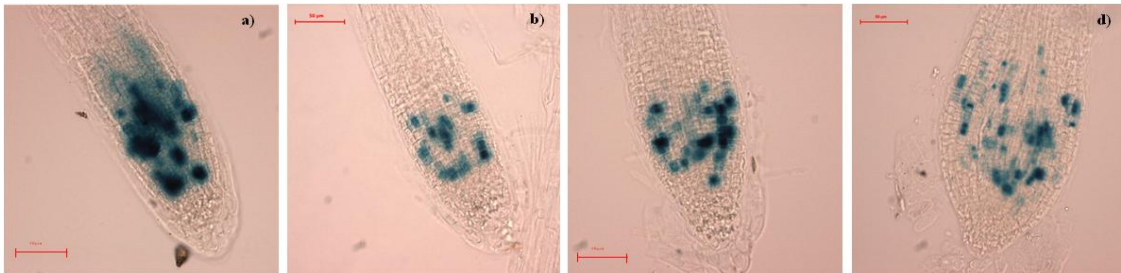


Figura 32. Localización y cuantificación de la expresión de ciclina B1 en meristemas radiculares de plántulas de dos días expuestas a las diferentes posiciones del Levitador. A) Localización de la expresión de la ciclina B1. Microscopía óptica en campo claro de muestras crecidas durante 2 días en diferentes condiciones de gravedad simulada: a) control 1g, b) 0g*, c) 1g* y d) 2g*. B) Cuantificación de la Densidad Óptica Integrada (D.O.I.). La cuantificación relativa de la D.O.I. de la actividad β -glucuronidasa se representa en diagrama de barras como media de la D.O.I. \pm la desviación estándar. Se observa una fuerte disminución de expresión de ciclina B1, en las posiciones 1g* y 0g* con respecto al control 1g (externo). Si utilizamos como control la posición 1g*, se produce una disminución de expresión en microgravedad simulada y un aumento en hipergravedad (no se muestra representado el nivel de significación en la figura). ($p < 0,05$; se representa con un *).

observa una fuerte disminución de expresión, estadísticamente significativa al compararlo con ambos controles (1g/1g*; Figuras 32 y 33). Si comparamos los resultados de hipergravedad simulada con la posición 1g*, obtenemos un considerable aumento de expresión en las muestras crecidas durante 2 días y sin embargo, una disminución a los 4 días (Figuras 32 y 33).

Plántulas de 4 días

A) Localización *in situ*



B) Cuantificación D.O.I

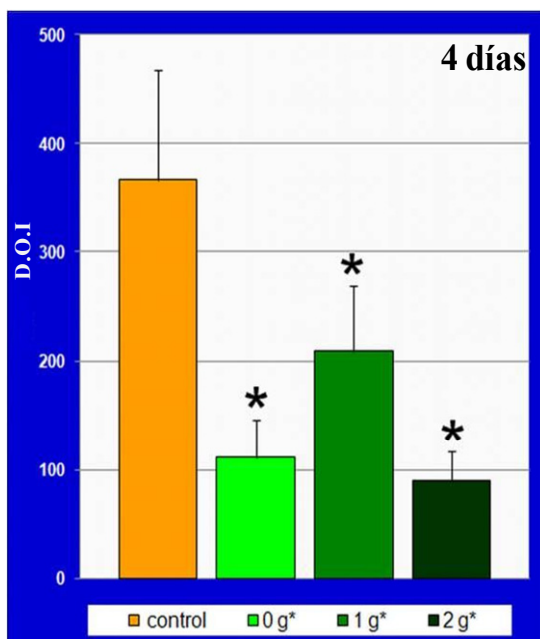


Figura 33. Localización y cuantificación de la expresión de ciclina B1 en meristemos radiculares de plántulas de cuatro días expuestas a las diferentes posiciones del Levitador . A) Localización de la expresión de la ciclina B1. Microscopía óptica en campo claro de muestras crecidas durante 4 días en diferentes condiciones de gravedad simulada: a) control 1g, b) 0g*, c) 1g* y d) 2g*. B) Cuantificación de la Densidad Óptica Integrada (D.O.I). La cuantificación relativa de la D.O.I. de la actividad β - glucuronidasa se representa en diagrama de barras como media de la D.O.I \pm la desviación estándar. Se observa una fuerte disminución de expresión de ciclina B1, en las posiciones 1g*, 0g* y 2g* con respecto al control 1g (externo). Si utilizamos como referencia el control interno (1g*) se produce una disminución de expresión tanto en microgravedad, como en hipergravedad simulada (no se muestra representado el nivel de significación en la figura).

($p < 0,05$; se representa con un *).

1.4. Estudios morfométricos del meristemo radicular sometido a campos magnéticos

Las muestras incluidas en LR White (LRW) se cortaron en cortes semifinos ($2\mu\text{m}$) y fueron fotografiadas a microscopía óptica de contraste de fase a diferentes aumentos para estudios morfométricos, como se describe a continuación:

1.4.1. Anchura del meristemo de la raíz

Sobre las fotos obtenidas de cortes semifinos se midió la anchura del meristemo en cada una de las muestras para los diferentes tiempos de crecimiento. Las muestras sometidas al tratamiento 2g* y únicamente a 4 días de crecimiento, desarrollaron un meristemo más ancho al que se obtuvo en condiciones de gravedad terrestre (1g; Figura 34).

A) Cortes semifinos del meristemo radicular

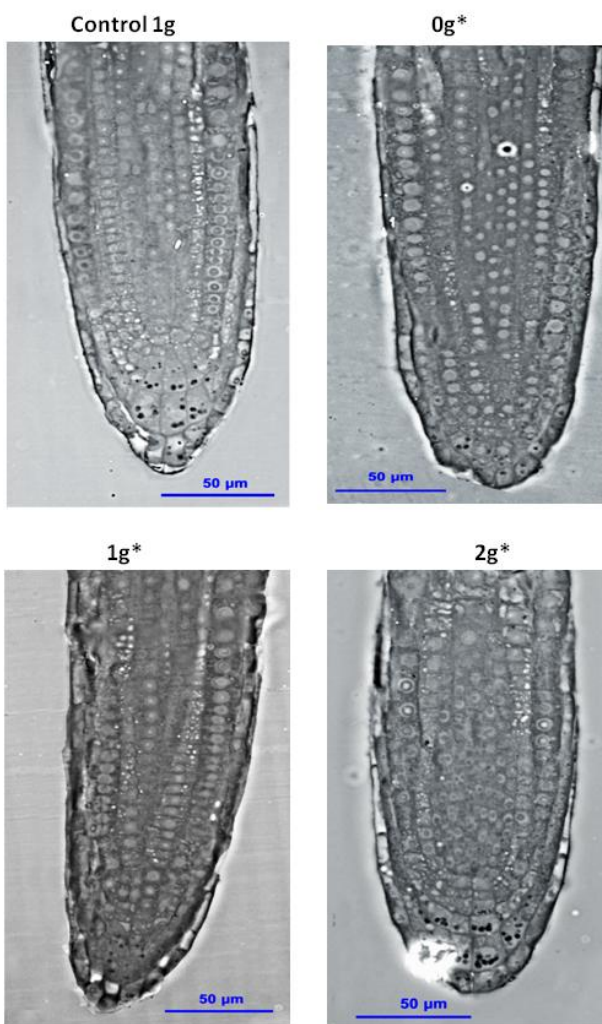
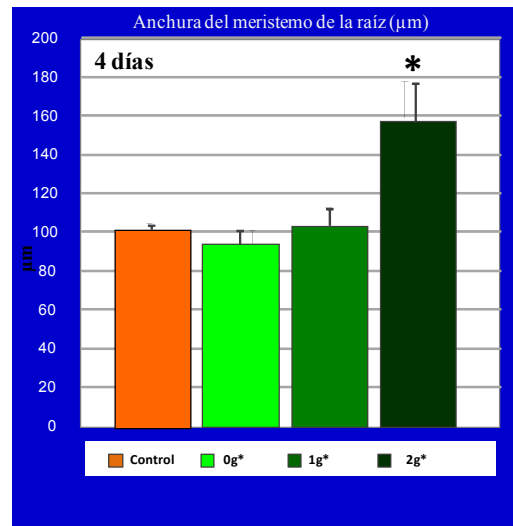


Figura 34. Anchura del meristemo de la raíz en el levitador magnético. A) Cortes semifinos de meristemos radiculares de plántulas crecidas en distintas condiciones en el Levitador. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fase con muestras crecidas durante 4 días. B) Cuantificación de la anchura media del meristemo radicular. Se representan en diagrama de barras las medias de la anchura del meristemo radicular de cada una de las muestras con sus respectivas desviaciones estándar (\pm). Las diferencias fueron significativas entre el control 1g y 2g* ($p < 0,05$ (*)).

B) Cuantificación de la anchura del meristemo radicular



1.4.2. Proliferación celular: n° células/unidad de longitud (mm)

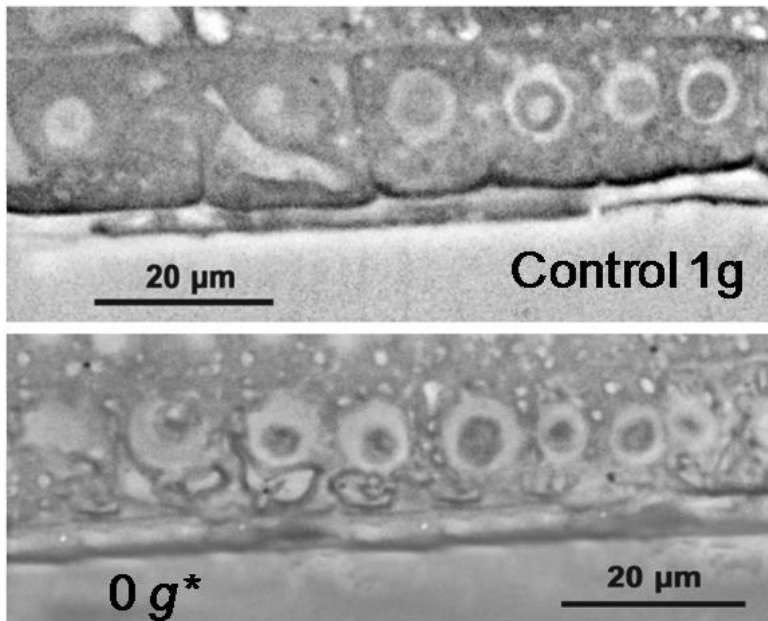
Como medida de la tasa de proliferación celular se evaluó el número de células por unidad de longitud (mm) en las filas de células meristemáticas del cilindro cortical de la raíz. La variación de este parámetro con el tiempo se ha denominado “Tasa de producción celular local” (Beemster y Baskin, 1998; Fiorani y Beemster, 2006). Las medidas se realizaron sobre cortes semifinos (2 μm) observados en microscopía de contraste de fase.

Las plántulas expuestas a microgravedad simulada efectiva (0g*) mostraron más células por unidad de longitud (mm) que las del control 1g, tanto a 2 como a 4 días de crecimiento (Figura 35). Estos datos se corroboraron estadísticamente, encontrándose diferencias significativas con una $p < 0,05$ (Figura 35). Se observó un aumento de proliferación celular en las muestras crecidas en el interior del Levitador con 2 días de crecimiento sometidas sólo al campo magnético (1g*); sin embargo a los 4 días estas diferencias desaparecieron. Se encontró un aumento de proliferación celular en el tratamiento 2g* a dos días de crecimiento. Cuando comparamos las muestras sometidas a gravedad alterada con el control interno 1g*, observamos diferencias significativas sólo en microgravedad simulada (a ambos puntos de toma de muestras), produciéndose un aumento de la proliferación celular.

1.4.3. Tamaño nucleolar (μm^2)

El tamaño nucleolar fue medido en las células meristemáticas del cilindro cortical de la raíz (que presentaban mayor actividad nucleolar), sobre cortes semifinos (2 μm) observados por microscopía de contraste de fase. No se apreciaron diferencias importantes entre los diferentes controles (1g y 1g*) en ninguno de los experimentos. Se encontraron diferencias significativas entre los controles y el tratamiento 0g* a los 2 y 4 días, mientras que en el tratamiento 2g* sólo se encontró una disminución del tamaño nucleolar, a los 4 días (siendo este efecto menor que el encontrado en 0g*; Figura 36).

A) Cortes semifinos (contraste de fase) de muestras crecidas durante 4 días



B) Cuantificación de proliferación celular en muestras crecidas durante 2 y 4 días

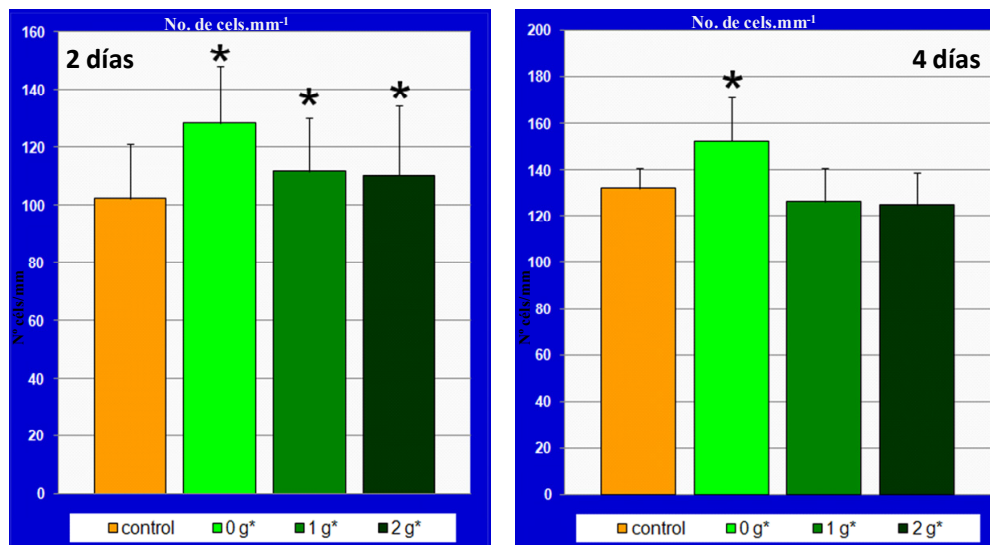
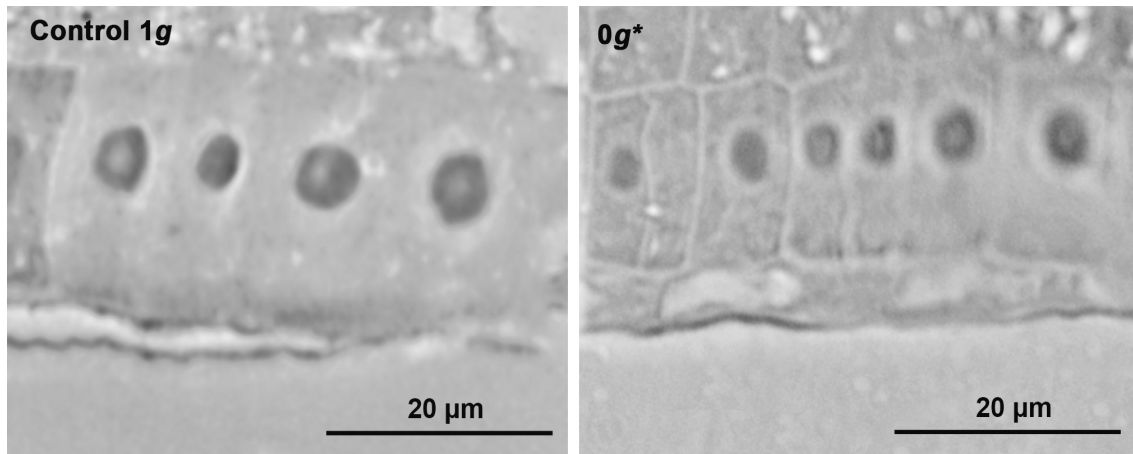


Figura 35. Microscopía óptica en contraste de fases de la muestra crecida 4 días en posición 0g* en el interior del Levitador y de su control 1g. A) Proliferación celular en plántulas del experimento en el Levitador magnético. B) Proliferación celular media (n° células /mm) en muestras crecidas durante 2 y 4 días en el Levitador. Encontramos un aumento de proliferación celular en todas las posiciones del Levitador a los 2 días de crecimiento con respecto al control. Sin embargo a los 4 días sólo se encontraron diferencias en la posición 0g* (microgravedad simulada). Si comparamos nuestras condiciones de micro- e hiper- gravedad simulada con el control interno (1g*), encontramos un aumento de proliferación celular en muestras sometidas a 0g* (el nivel de significación no se representa en la figura).

Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

A) Microscopía de contraste de fase de muestras crecidas durante 2 días



B) Cuantificación del tamaño nucleolar (μm^2)

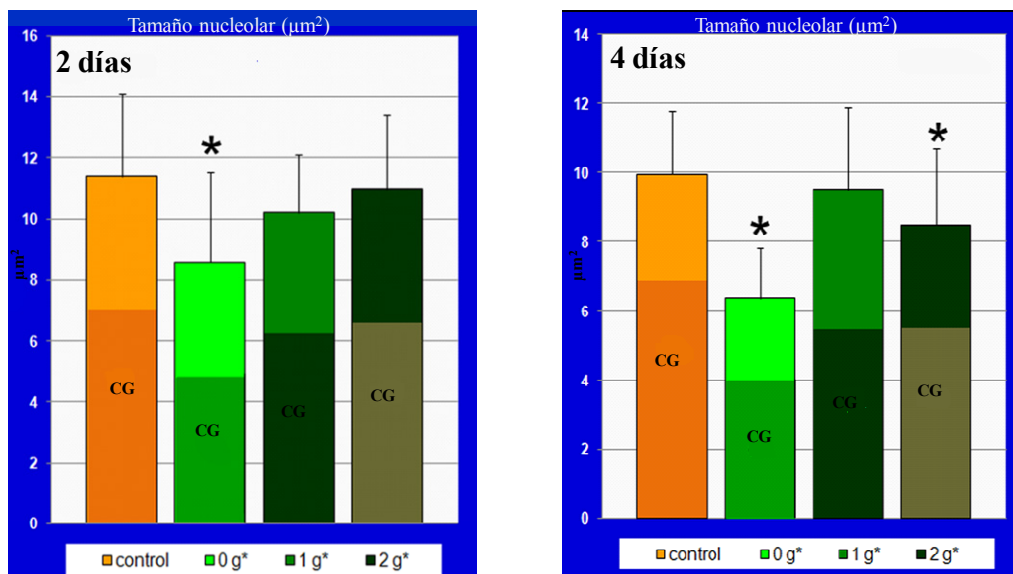


Figura 36. Tamaño nucleolar en muestras crecidas en el Levitador. A) Microscopía en contraste de fase de una muestra crecida en microgravedad simulada durante 2 días en el interior del Levitador y de su control 1g. B) Cuantificación del tamaño nucleolar tras 2 y 4 días en el Levitador con respecto al control 1g. Se produce una disminución significativa del tamaño nucleolar en microgravedad simulada. Sólo disminuye el tamaño nucleolar en muestras sometidas a hipergravedad simulada a los 4 días de crecimiento. Se representa la cantidad de componente granular (CG) con respecto al tamaño nucleolar, encontrándose proporciones similares en todas las muestras. También se produce una disminución del tamaño nucleolar en microgravedad simulada con respecto a 1g* (no aparece representado en la figura el nivel de significación).

Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

1.5. Estudios ultraestructurales e inmunocitoquímicos de cuantificación de nucleolina

Para determinar la funcionalidad del nucleolo, hicimos un estudio estructural y de inmunolocalización de nucleolina en cortes ultrafinos de las muestras incluidas en LRW y visualizados a microscopía electrónica de transmisión.

Para el estudio estructural se utilizaron las muestras procesadas por el protocolo de metilación-acetilación, ya que este método permite una mejor visualización de los componentes subnucleolares, principalmente permite distinguir el Componente Fibrilar Denso (CFD) del Componente Granular (CG). Se llevó a cabo una cuantificación del CFD y del CG a microscopía electrónica y se calculó la media de cada subcomponente, teniendo en cuenta el tamaño nucleolar. Los resultados no indican ninguna diferencia significativa a nivel del patrón de distribución de los componentes subnucleolares. La cantidad de cada componente es proporcional al tamaño nucleolar, manteniéndose la proporción para los diferentes tratamientos de los experimentos (Figura 37).

Se realizó una inmunolocalización (sobre muestras procesadas por el protocolo convencional) y cuantificación de la proteína AtNUC-L1 (nucleolina), como marcador de biogénesis de ribosomas y por consiguiente de crecimiento celular (González-Camacho y Medina, 2006). La nucleolina se encuentra principalmente en el CFD alrededor de los Centros Fibrilares (CFs; Figura 38), manteniéndose el patrón de distribución normal de la proteína. Los resultados de la cuantificación de partículas de inmuno-oro muestran diferencias significativas en las muestras sometidas a 0g* y 2g* frente a los controles 1g y 1g* para diferentes tiempos de crecimiento (Figura 39). Estos resultados indican un menor nivel de nucleolina en condiciones de gravedad alterada.

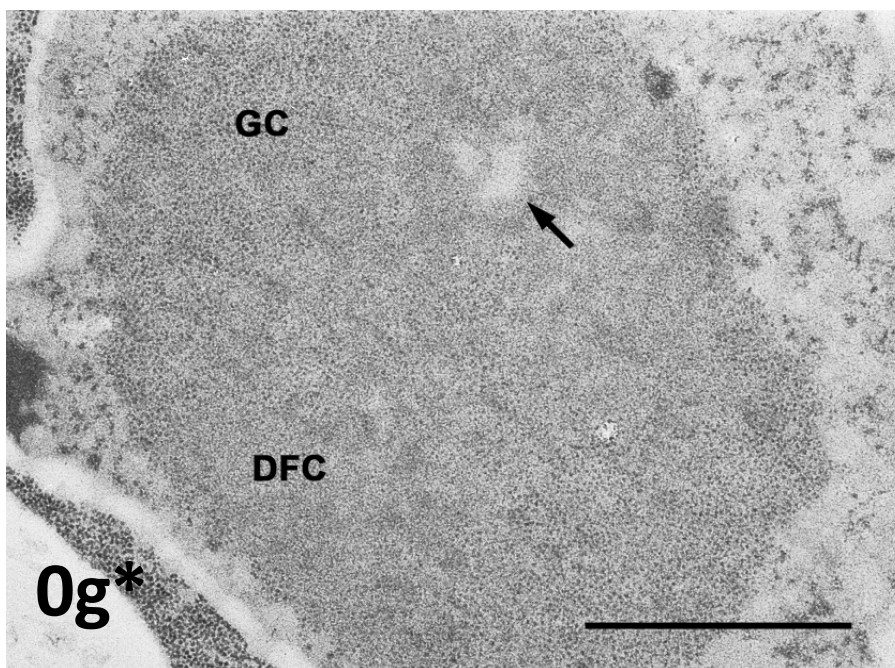
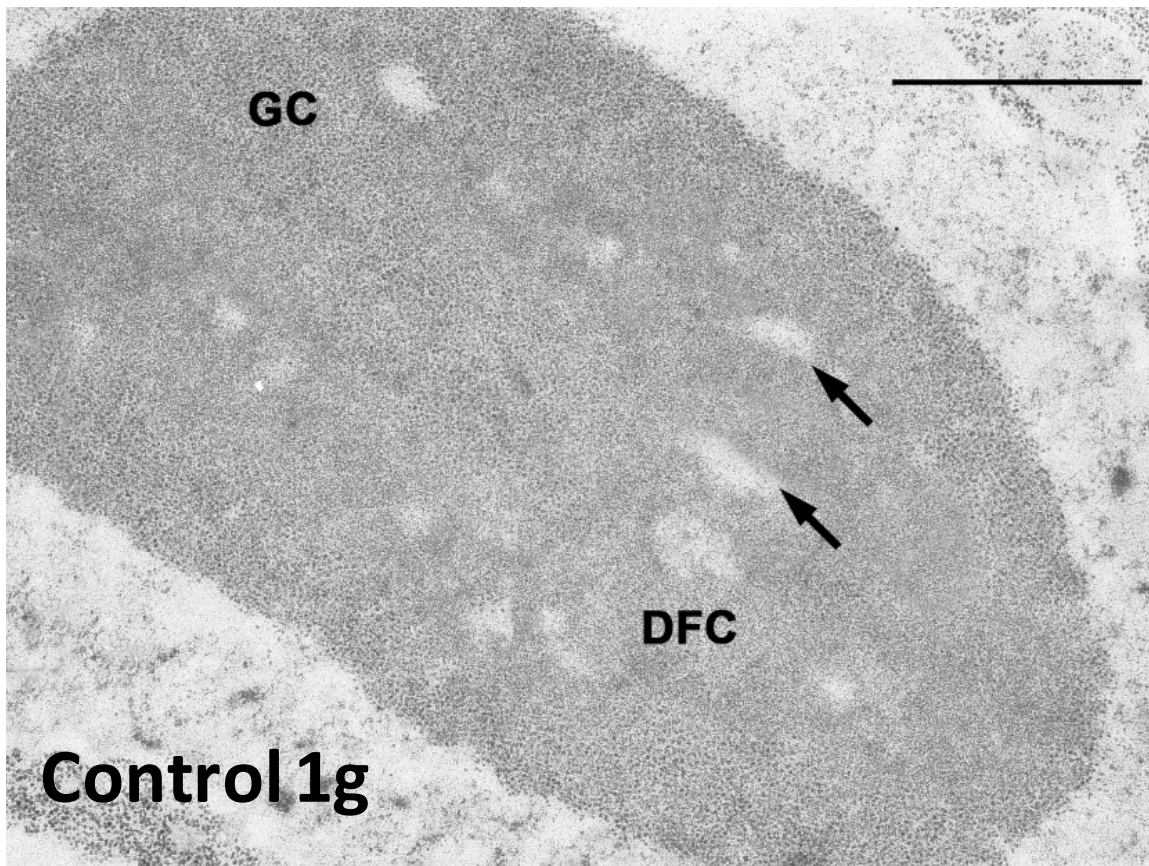


Figura 37. Nucleolos activos de células meristemáticas del cilindro cortical de la raíz, observadas en microscopía electrónica a los 4 días de crecimiento en el simulador magnético (a igual escala, las barras indican 1 μm). Se observan los diferentes componentes del nucleolo: CFs (flechas) hacia el interior del nucleolo rodeados por el CFD y periféricamente se encuentra el CG. Como se puede observar en la figura el nucleolo de la muestra 0g* es más pequeño que el control 1g, lo que indica que presenta una menor actividad nucleolar.

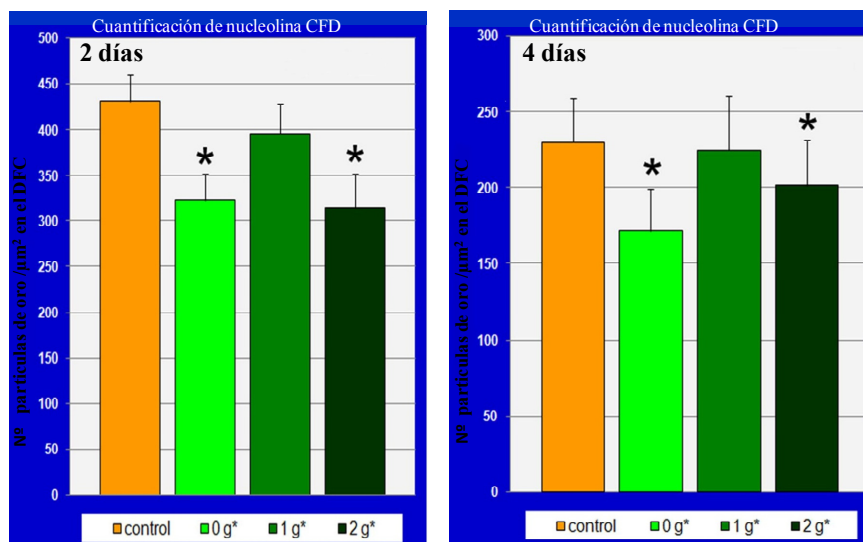
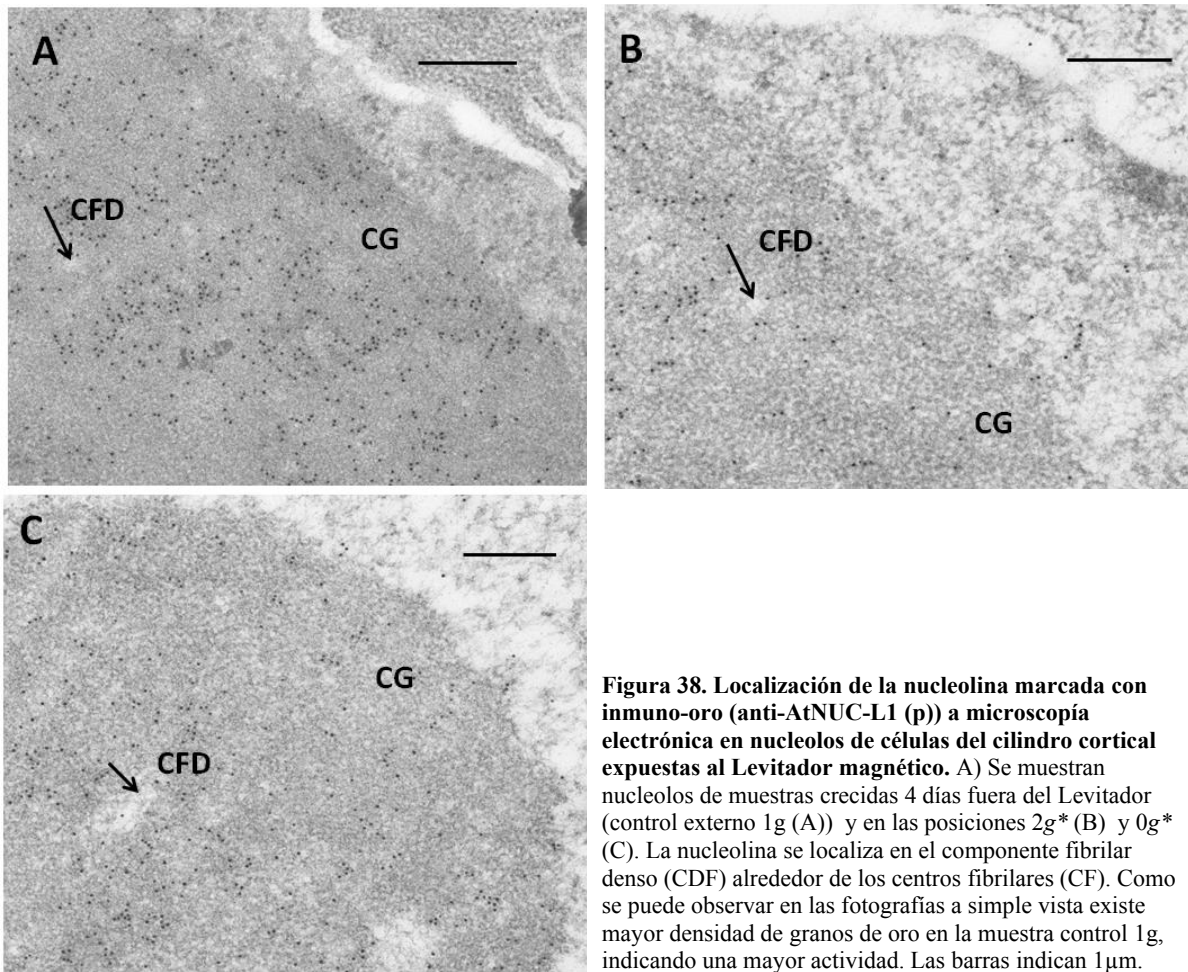


TABLA 2. Resumen de los resultados obtenidos con la línea CYCB1;1 en el Levitador magnético					
Parámetros		Días crecimiento	0g*	1g*	2g*
Longitud de las plántulas	Control 1g	2d	-	=	++
	Control 1g*		-		++
	Control 1g	4d	++	+	+
	Control 1g*		+		=
Tasa de proliferación celular	Control 1g	2d	++	+	+
	Control 1g*		+		=
	Control 1g	4d	++	=	=
	Control 1g*		++		=
Expresión de ciclina B1	Control 1g	2d	--	-	=
	Control 1g*		=		++
	Control 1g	4d	--	-	--
	Control 1g*		-		-
Biogénesis de ribosomas (Tamaño nucleolar)	Control 1g	2d	--	=	=
	Control 1g*		--		=
	Control 1g	4d	--	=	-
	Control 1g*		--		=
Biogénesis de ribosomas (nucleolina)	Control 1g	2d	--	=	--
	Control 1g*		--		-
	Control 1g	4d	--	=	-
	Control 1g*		--		=
Diferencias: ++/-- fuertes +/- leves = sin diferencias					

2. Estudio de la línea transgénica *CYCB1:uidA*, en la Centrífuga de Gran Diámetro (LDC; Holanda, ESA-ESTEC)

Con objeto de estudiar específicamente los efectos de la hipergravedad, de los que ya poseíamos datos iniciales a partir de los resultados obtenidos en la posición 2g* del Levitador Magnético, que era necesario corroborar, realizamos un experimento secuencial, (plántulas crecidas a 2 y 4 días tras la germinación; ver detalle del diseño experimental en la figura 40) utilizando la línea transgénica *CYCB1:uidA*, en la Centrífuga de Gran Diámetro (LDC). Las condiciones del experimento fueron similares a las del experimento realizado en el Levitador magnético, descrito en la sección 1 de estos Resultados. Se aplicaron dos condiciones de gravedad alterada diferentes, 2g (doble de la gravedad terrestre) y 6g. Los resultados obtenidos se compararon con dos experimentos control: el primero de ellos, el control 1g externo al aparato, como referencia básica de los parámetros en condiciones fisiológicas; el segundo, denominado "control 1g rotacional" se realizó en el interior del aparato, en un compartimento o "góndola" situado en el centro de rotación, donde no hay alteración de la gravedad, pero están presentes los demás factores que pueden afectar al crecimiento normal, como pueden ser, entre otros, la vibración o los cambios de temperatura.

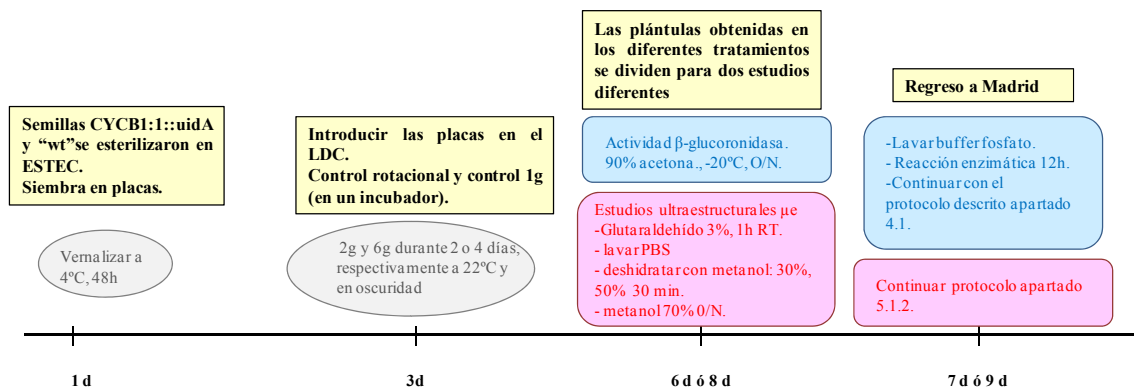


Figura 40. Diseño experimental con la línea transgénica *CYCB1:1:uidA* en la Centrífuga (LDC)

2.1. Longitud de las plántulas

En plántulas con 2 días de crecimiento no se obtuvieron diferencias significativas en longitud, en relación con ninguno de los dos controles (1g/ rotacional), para ninguno de los tratamientos (Figuras 41 y 42). Sin embargo, encontramos

diferencias significativas entre los controles, atribuibles a la vibración asociada a la simulación mecánica y/o a una ligera diferencia de temperatura (variación como máximo de 1°C extra detectado en la góndola central, donde se deposita la muestra control rotacional). Las plántulas que crecieron durante 4 días en condiciones de hipergravedad (2g y 6g) presentaban un aumento en longitud con respecto al control externo 1g ($p < 0,05$). Las muestras en la posición 2g eran algo más largas, pero sin alcanzar la significación estadística frente al control rotacional. Esta diferencia redonda de nuevo en un aumento significativo en la longitud de las plántulas en las muestras del control rotacional con respecto al control 1g ($p < 0,05$; Figuras 41 y 42).

Cuando cuantificamos la longitud de la raíz no encontramos diferencias significativas en ningún tratamiento al compararse con sus respectivos controles (Figuras 41 y 42).

A) Muestras crecidas durante 2 días en la Centrifuga LDC

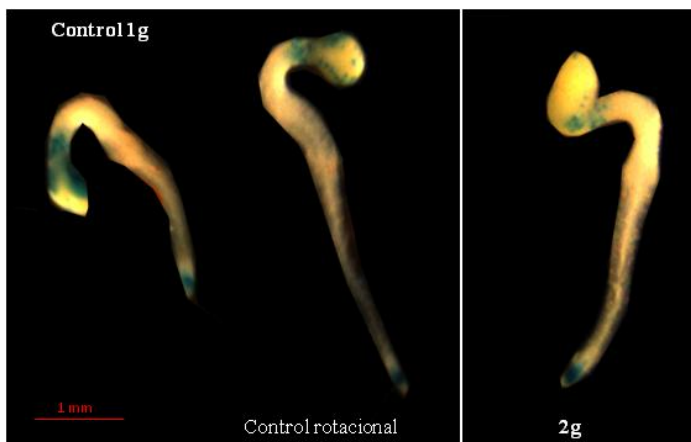
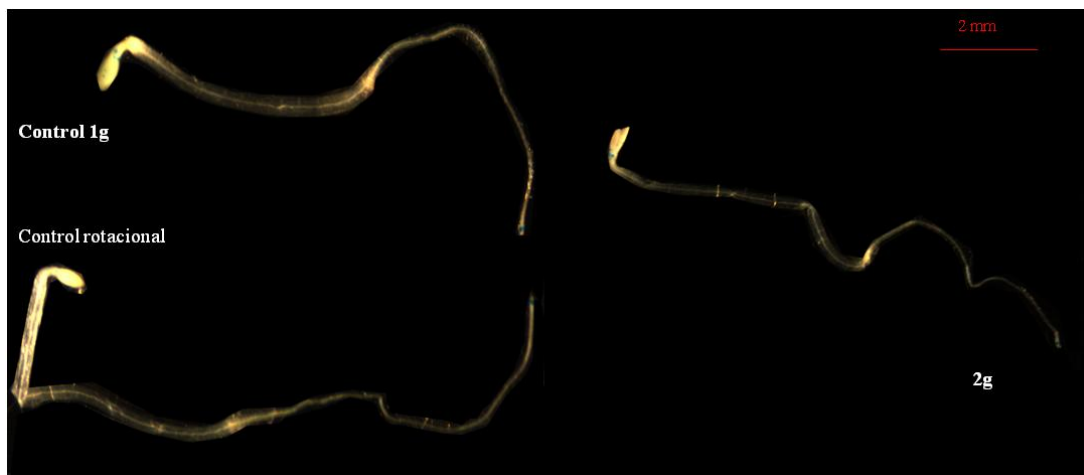


Figura 41. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* del experimento 2g en la LDC. A) Muestras crecidas durante 2 días. B) Muestras crecidas durante 4 días. En ambos casos se muestran tres plántulas, una correspondiente a la muestra sometida al doble de gravedad y otras dos imágenes que se corresponden con los respectivos controles realizados simultáneamente.

B) Muestras crecidas durante 4 días en la Centrifuga LDC



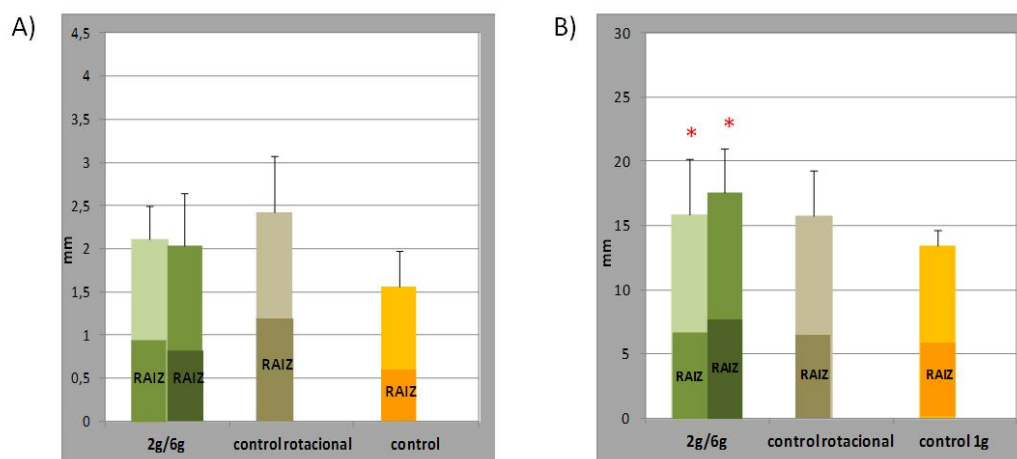


Figura 42. Longitud media de las plántulas y de las raíces (mm) en los experimentos de 2g y 6g. A) Experimento LDC de 2 días: No existen diferencias significativas al comparar el experimento 2g o 6g con el control externo 1g. Existe un aumento significativo en la longitud de las plántulas del control rotacional con respecto al control externo (este nivel de significación no se muestra en la figura). B) Experimento LDC de 4 Días: Se produce un aumento en la longitud de las plántulas del tratamiento 2g y 6g con respecto al control 1g externo (*), y también hay diferencias entre ambos controles, aumentado la longitud en las plántulas del control rotacional (no se indica este valor de significación en la figura). Se representa en ambas gráficas, la longitud de las raíces con respecto a la longitud total de la plántula entera. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*).

2.2. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

Utilizando el mismo abordaje empleado en los experimentos realizados en el Levitador magnético, con la misma línea transgénica, se detectó *in situ* la actividad del promotor del gen de la ciclina B1 y se evaluó cuantitativamente.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en la expresión de la ciclina B1 en muestras crecidas durante 2 días a 2g (Figura 43) con respecto a los dos controles, sin encontrar diferencias significativas entre ellos. Se observó el mismo resultado comparando el tratamiento 6g con el control rotacional, encontrando un aumento de expresión significativa ($p < 0,05$; Figura 43). En plántulas crecidas durante 4 días en la LDC encontramos el efecto opuesto, es decir, una disminución significativa en las muestras sometidas a hipergravedad 2g o 6g, al compararlo con ambos controles que son estadísticamente iguales. (Figura 44).

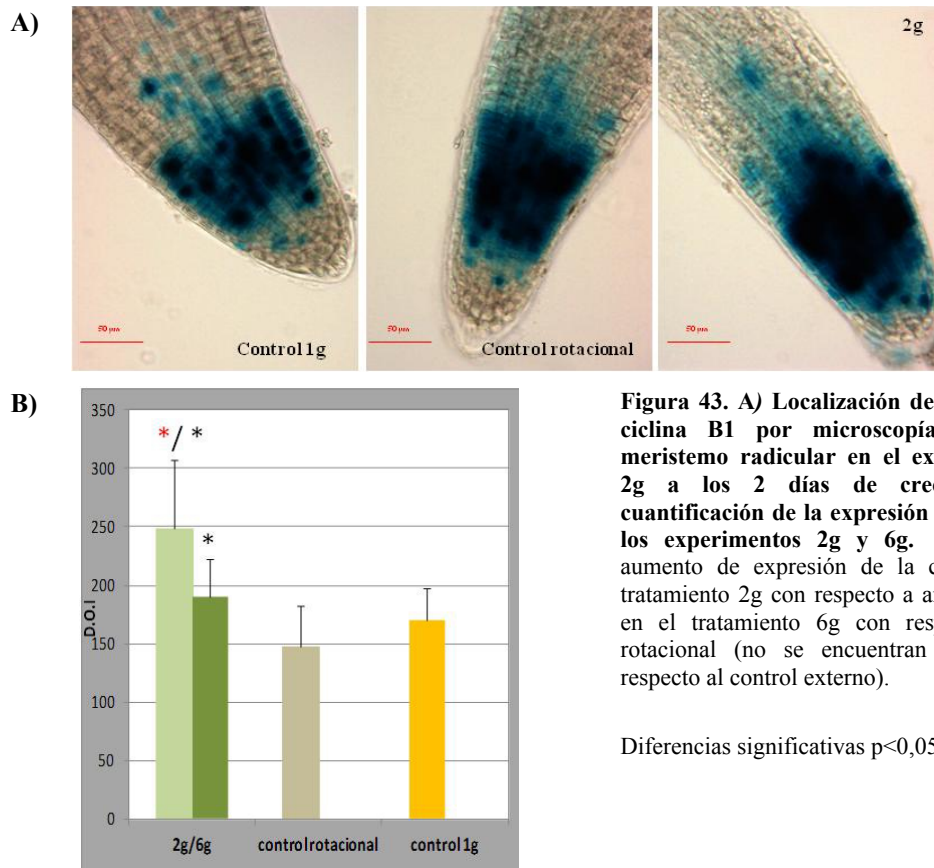


Figura 43. A) Localización de la expresión de ciclina B1 por microscopía óptica en el meristemo radicular en el experimento LDC 2g a los 2 días de crecimiento y **B)** cuantificación de la expresión de ciclina B1 en los experimentos 2g y 6g. Se produce un aumento de expresión de la ciclina B1 en el tratamiento 2g con respecto a ambos controles y en el tratamiento 6g con respecto al control rotacional (no se encuentran diferencias con respecto al control externo).

Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

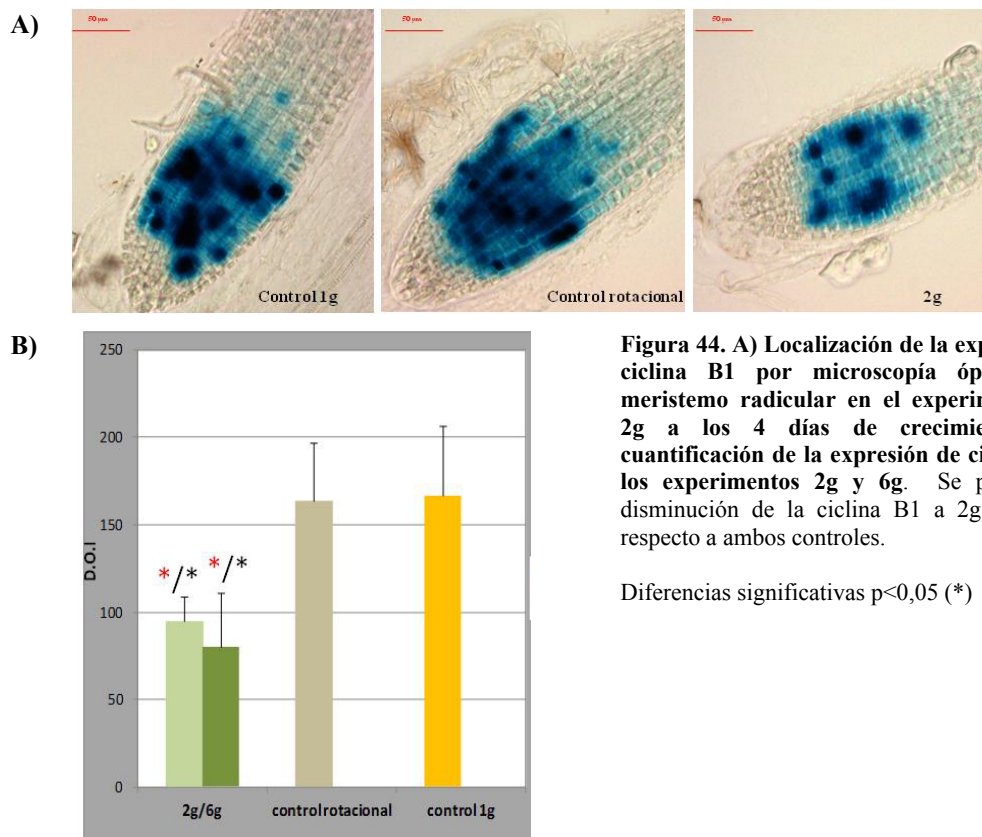


Figura 44. A) Localización de la expresión de ciclina B1 por microscopía óptica en el meristemo radicular en el experimento LDC 2g a los 4 días de crecimiento y **B)** cuantificación de la expresión de ciclina B1 en los experimentos 2g y 6g. Se produce una disminución de la ciclina B1 a 2g y 6g con respecto a ambos controles.

Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

2.3. Estudios morfométricos del meristemo radicular

A partir de muestras incluidas en LRW, en las diversas condiciones experimentales y controles, realizamos cortes semifinos ($2\mu\text{m}$) que observamos a microscopía óptica de contraste de fase a diferentes aumentos para estudios morfométricos, como se describe a continuación:

2.3.1. Anchura del meristemo de la raíz

El meristemo radicular en plántulas sometidas a hipergravedad era más ancho que el de ambos controles (no viéndose diferencias entre ellos). Esta tendencia común sólo alcanzó la significación estadística ($p < 0,05$) en el experimento 6g de 2 días de crecimiento. Este efecto también fue observado en el Levitador magnético (a $2g^*$ y a 4 días de crecimiento).

2.3.2. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm)

Se cuantificó la proliferación celular midiendo el número de células por fila en el cilindro cortical por unidad de longitud (mm), en cortes semifinos ($2\mu\text{m}$) observados en contraste de fase, en el cilindro cortical del meristemo radicular.

A los dos días de crecimiento en ambas condiciones de hipergravedad se produce una disminución en el número de células por unidad de longitud al compararlo con ambos controles (Figuras 45 y 46); por lo tanto existe una menor proliferación celular (menor tasa de división celular). No hay diferencias entre ambos controles para este parámetro. A los cuatro días de crecimiento no se encuentran diferencias significativas (Figuras 45 y 46), excepto en la comparación del tratamiento 6g con su control rotacional.

2.3.3. Tamaño nucleolar (μm^2)

Medimos el tamaño nucleolar en cortes semifinos ($2\mu\text{m}$) de las células meristemáticas del cilindro cortical de la raíz observadas en microscopía de contraste de fase. Tras 2 días en un ambiente $2g$ ó $6g$, las muestras mostraban un nucleolo reducido con respecto al control $1g$. Sorprendentemente, los nucleolos del control rotacional son

aun menores al control 1g (Figuras 47 y 48). En coherencia con lo anterior, existen diferencias signi-

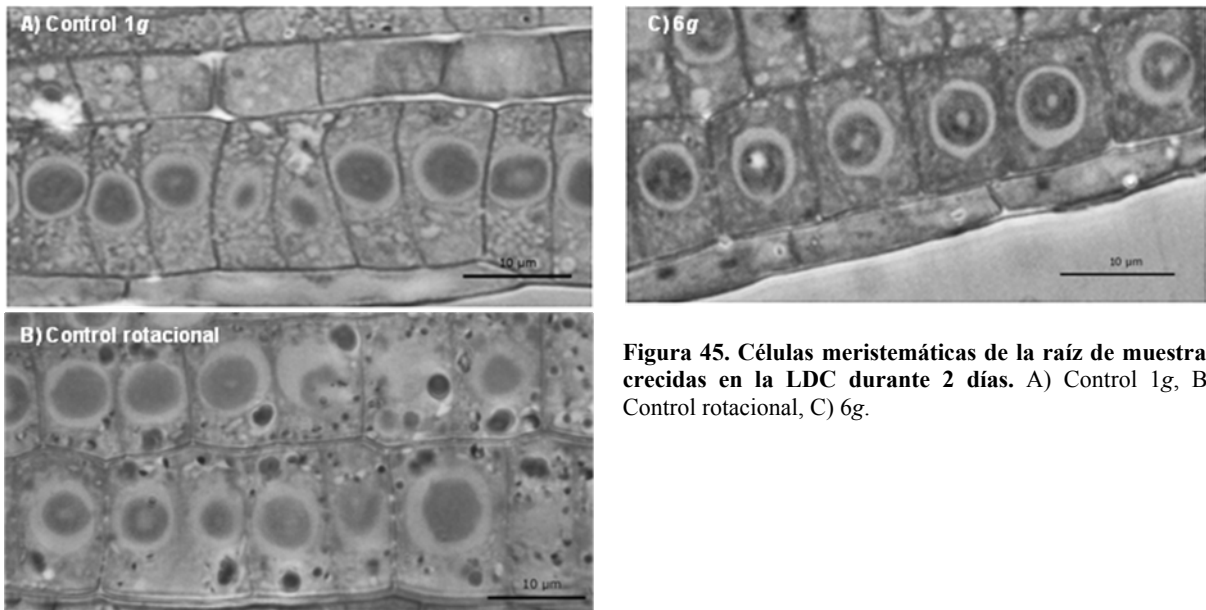


Figura 45. Células meristemáticas de la raíz de muestras crecidas en la LDC durante 2 días. A) Control 1g, B) Control rotacional, C) 6g.

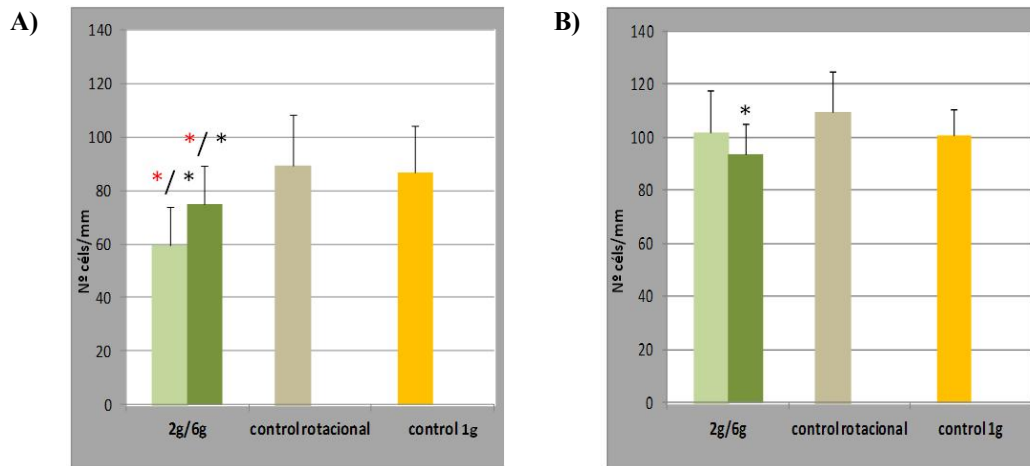


Figura 46. Proliferación celular (n°células/mm) en plántulas crecidas 2 días (A) y 4 días (B) en la LDC. La cantidad de células por mm disminuyó en muestras sometidas a hipergravedad (2g y 6g) durante 2 días con respecto a ambos controles (1g y rotacional). A 4 días de crecimiento se produce una disminución en 6g con respecto al control rotacional. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*).

ficativas entre los controles ($p < 0,05$). A los 4 días de crecimiento se observa un efecto similar de la hipergravedad sobre el tamaño nucleolar, una disminución en el área nucleolar con respecto al control 1g, pero no tanto como en el control rotacional, existiendo diferencias entre ambos controles (Figuras 47 y 48).

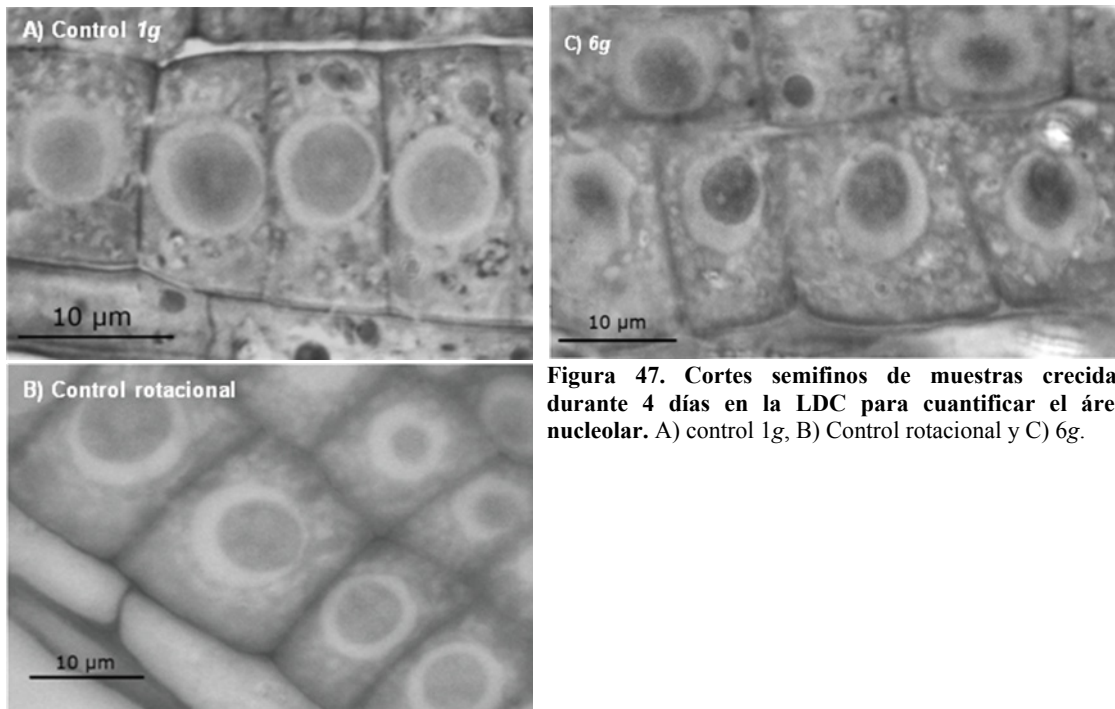


Figura 47. Cortes semifinos de muestras crecidas durante 4 días en la LDC para cuantificar el área nucleolar. A) control 1g, B) Control rotacional y C) 6g.

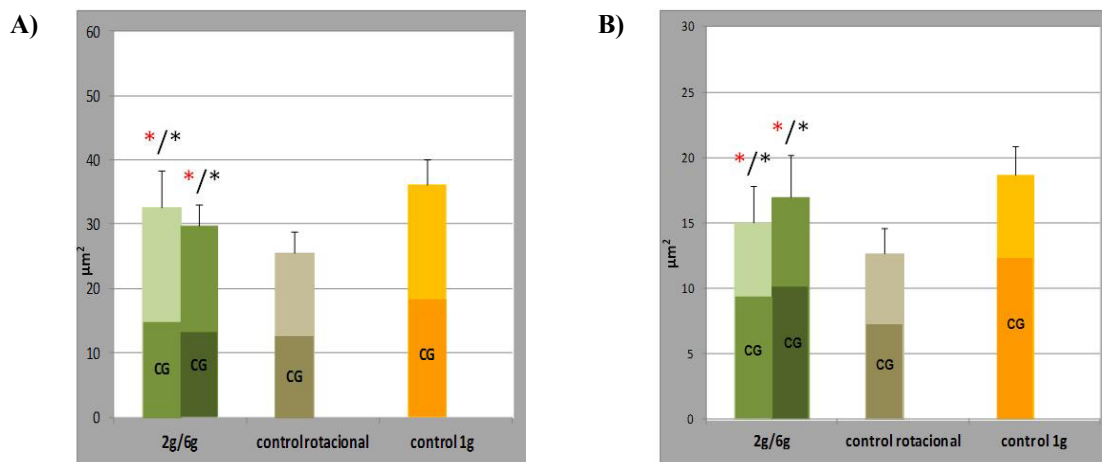


Figura 48. Área nucleolar en plántulas crecidas 2 días (A) y 4 días (B) en la LDC (experimento 2g y 6g). En ambos tratamientos (2g y 6g) se produce una disminución con respecto al control 1g, pero un aumento en el área del nucleolo con respecto al control rotacional. Existen diferencias entre ambos controles, disminución en el área del nucleolo en el control rotacional (no se muestra el nivel de significación en la figura). A 4 días, los efectos son significativamente iguales a los de 2 días. Se representa el porcentaje del componente granular en proporción al área total nucleolar en todos los tratamientos. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

2.4. Estudios ultraestructurales en el nucleolo

El estudio estructural se realizó sobre cortes ultrafinos de muestras incluidas en LRW visualizados a microscopía electrónica de transmisión, utilizando la misma metodología para la preparación de muestras y para el estudio cuantitativo que en el experimento del Levitador magnético.

La cuantificación de los componentes subnucleolares no está significativamente alterada en ninguno de los tratamientos de hipergravedad (2g y 6g, Figuras 48 y 49). La cantidad de cada componente es proporcional al tamaño nucleolar en todas las muestras en las diferentes condiciones experimentales.

2.5. Resumen de las variaciones en la proliferación celular y el crecimiento celular observados en hipergravedad

Los resultados obtenidos en las dos condiciones de hipergravedad fueron prácticamente idénticos con respecto a los parámetros estudiados, indicando que un mayor nivel de gravedad (6g) no produce mayores alteraciones que las que se aprecian al doble de la gravedad terrestre (Tabla 3).

TABLA 3. Resumen de los resultados obtenidos con la línea CYCB1; 1 crecida en hipergravedad 2g o 6g					
Parámetros		Días crecimiento	2g	Control rotacional	6g
Longitud de las plántulas	Control 1g	2d	=	+	=
	Control rotacional		=		=
	Control 1g	4d	++	++	++
	Control rotacional		=		=
Tasa de proliferación celular	Control 1g	2d	--	=	--
	Control rotacional		--		--
	Control 1g	4d	=	=	=
	Control rotacional		=		--
Expresión de ciclina B1	Control 1g	2d	++	=	=
	Control rotacional		++		+
	Control 1g	4d	--	=	--
	Control rotacional		--		--
Biogénesis de ribosomas (Tamaño nucleolar)	Control 1g	2d	-	--	-
	Control rotacional		++		++
	Control 1g	4d	-	--	--
	Control rotacional		++		++

Diferencias: ++/-- fuertes +/- leves = sin diferencias

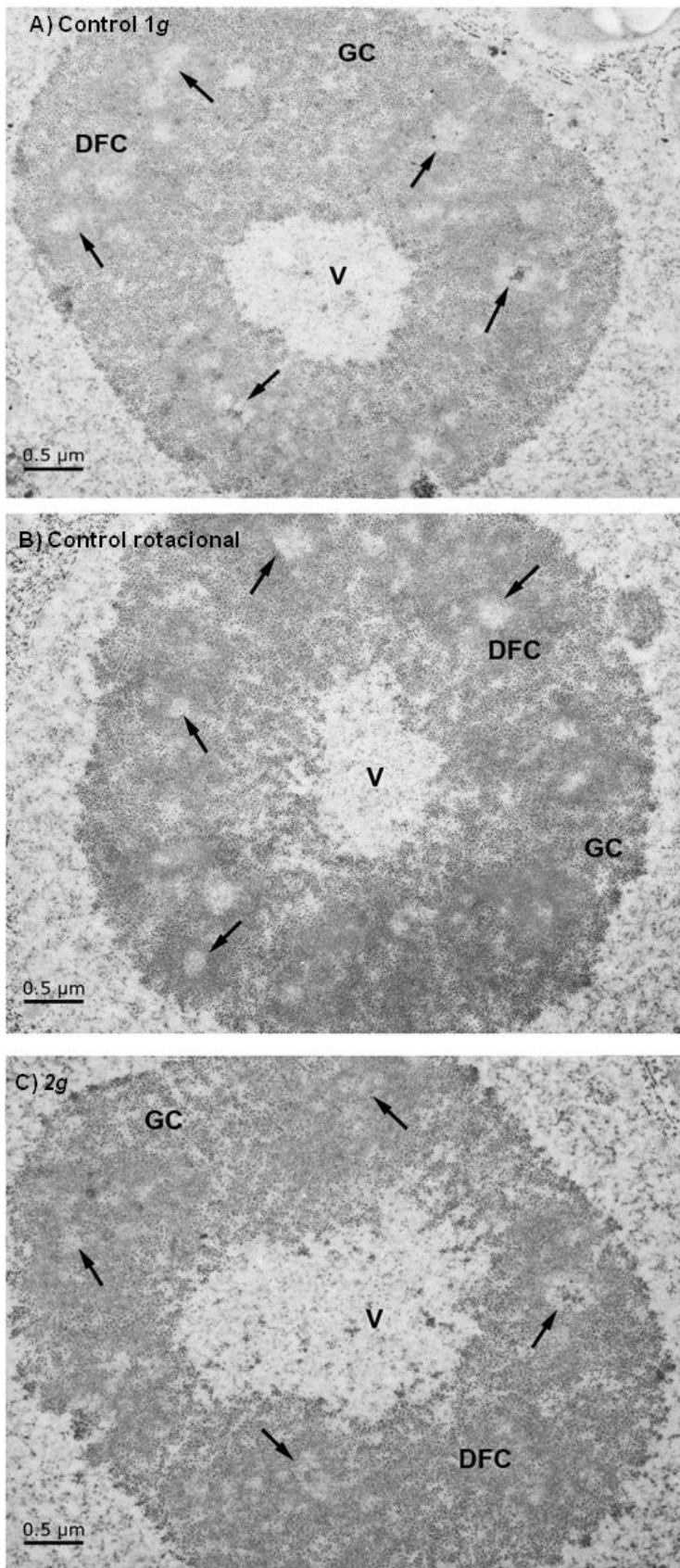


Figura 49. Nucleolos de muestras crecidas durante 2 días en la LDC (experimento 2g), observados a microscopía electrónica. A) Control 1g externo a la centrifuga; B) Control rotacional 1g, en el interior de la centrifuga; C) Muestra crecida en las condiciones experimentales en la LDC a 2g. Se destacan los diferentes componentes que conforman el nucleolo (DFC: componente fibrilar denso; GC: componente granular; V: vacuola nucleolar; flechas: centros fibrilares). En todos los casos, la morfología nucleolar corresponde a altos niveles de actividad de síntesis de ribosomas; sin embargo, no se observan diferencias relevantes a nivel ultraestructural entre las tres muestras.

3. Estudios de proliferación y crecimiento celular con la línea transgénica *CYCB1:uidA* sometida a diferentes condiciones gravitatorias en el levitador magnético (Nottingham, UK) en un medio de cultivo suplementado con una mayor cantidad de sacarosa

Todos los estudios anteriores en condiciones de gravedad alterada se han desarrollado en oscuridad con objeto de poder compararlos con los resultados del experimento en gravedad real (ISS) de nuestro laboratorio (Matía *et al.*, 2005; 2010), en el que las condiciones de crecimiento en la ISS estaban muy limitadas, de modo que las plántulas debieron crecerse en cajas opacas herméticamente cerradas. Las plántulas, en estas condiciones de crecimiento sin luz, no pueden desarrollar cloroplastos para realizar la fotosíntesis y por lo tanto su única fuente de carbono procede del medio de cultivo. Para limitar el estrés que puede suponer esa pérdida de luz, decidimos proporcionarles a las plántulas un medio de cultivo con triple concentración de sacarosa, y comprobar qué efecto produce la modificación de cantidad de nutrientes disponibles en el medio. El experimento fue por lo demás idéntico al anterior, de modo que evaluamos la proliferación y el crecimiento celular en plántulas transgénicas de la línea *CYCB1:uidA* a 2 y 4 días de crecimiento en oscuridad y a 22°C (Figura 50).

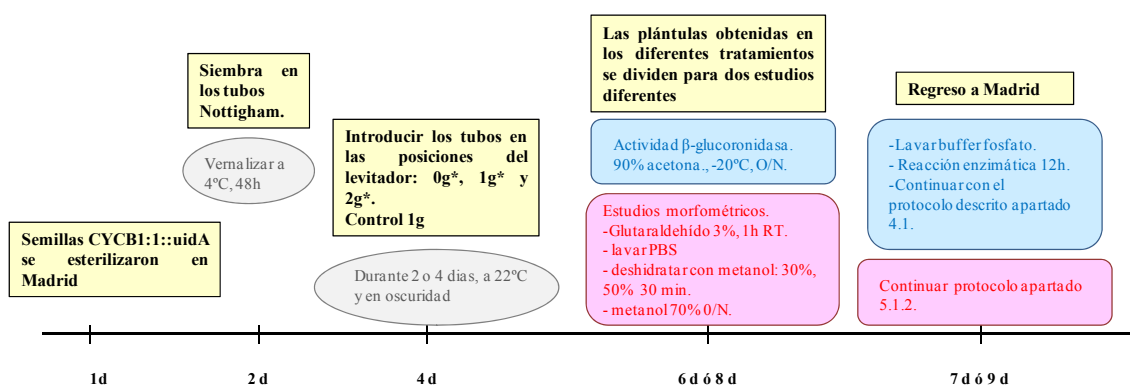


Figura 50. Diseño experimental con la línea transgénica *CYCB1:1:uidA* crecida con mayor concentración de sacarosa en el Levitador magnético (Nottingham).

Los resultados obtenidos demostraron una suavización generalizada de los efectos que se observaron en condiciones estándar de cultivo como se resume en la Tabla 4. En estos experimentos la longitud de las plántulas no se vio afectada en condiciones de gravedad alterada, sólo se produjo un aumento de longitud debido al campo magnético a 4 días de crecimiento. Tampoco encontramos diferencias en la longitud de la raíces para ninguno de los tratamientos a los diferentes días.

La tasa de proliferación celular, medida indirectamente por el número de células por milímetro en muestras crecidas durante 2 días en el Levitador, mostró un efecto contrario al observado en los experimentos anteriores con una concentración normal de sacarosa (Figura 51). Las muestras crecidas en gravedad alterada presentaban una disminución en la proliferación celular con respecto al control externo, excepto en la posición 0g*, donde no se producían cambios significativos. Por otra parte, cuando se compararon las muestras crecidas en micro- e hiper- gravedad alterada con el control interno, se encontró un aumento de proliferación celular, como ocurre en el experimento anterior (Figura 51). A 4 días de crecimiento el efecto que encontramos es igual al efecto observado en el experimento con medio de cultivo estándar (Figura 51). También encontramos un aumento en la anchura del meristemo radicular en muestras de 4 días de crecimiento en hipergravedad simulada (aunque no se muestra en la Tabla 4).

No se observó un efecto en la expresión de la ciclina B1 en plántulas con 2 días de crecimiento, medido indirectamente por la actividad β -glucuronidasa, a diferencia de lo que ocurrió con concentraciones normales de sacarosa donde si se observaba una disminución en la expresión. Los efectos a los 4 días son muy similares a los obtenidos anteriormente, aunque más leves.

El tamaño nucleolar (Figura 52) aumentó en plántulas con 2 días de crecimiento en todas las posiciones del Levitador; no sólo aparecieron alteraciones en las posiciones de gravedad alterada como ocurría anteriormente, sino también en las muestras sometidas sólo al efecto del campo magnético (1g*). Por el contrario el efecto observado a 4 días de crecimiento siguió el mismo patrón que en el experimento anterior, una disminución del tamaño nucleolar en micro- e hiper- gravedad.

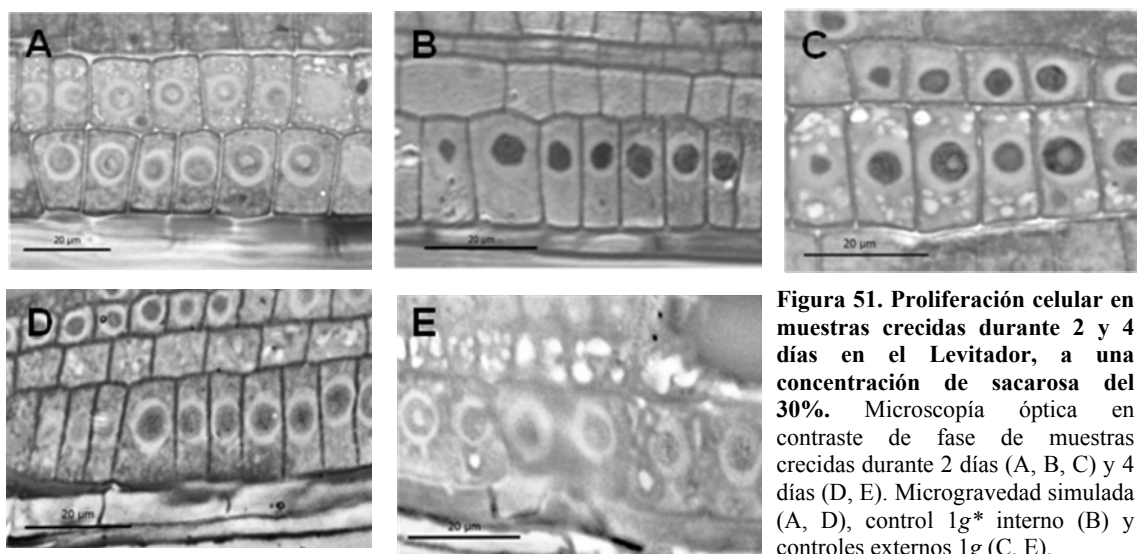


Figura 51. Proliferación celular en muestras crecidas durante 2 y 4 días en el Levitador, a una concentración de sacarosa del 30%. Microscopía óptica en contraste de fase de muestras crecidas durante 2 días (A, B, C) y 4 días (D, E). Microgravedad simulada (A, D), control 1g* interno (B) y controles externos 1g (C, E).

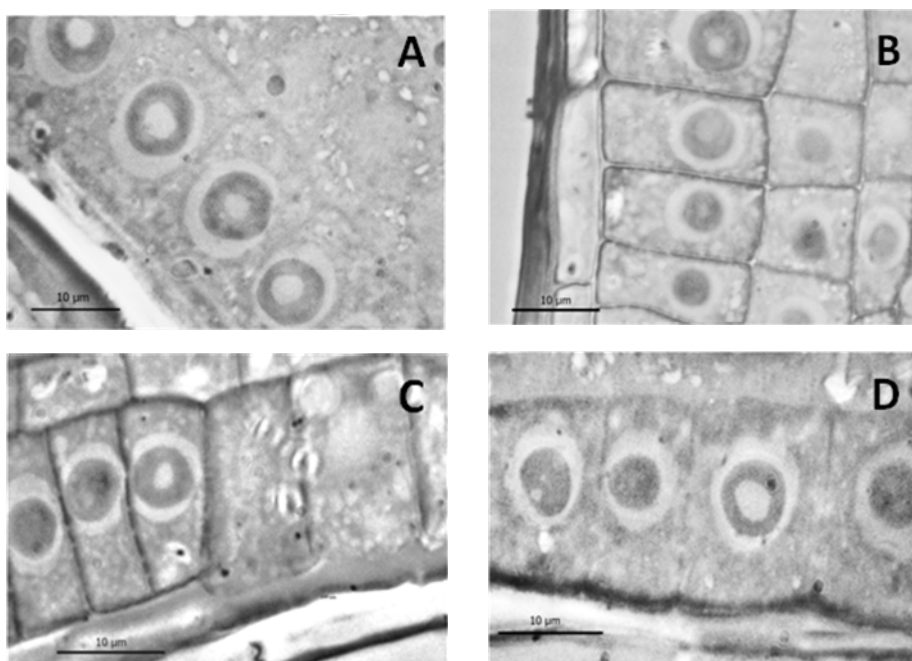


Figura 52. Tamaño nucleolar de muestras crecidas durante 2 y 4 días en el Levitador, a una concentración de sacarosa del 30%. Microscopía en contraste de fase de muestras sometidas a microgravedad simulada (A: 2 días; C: 4 días) y sus respectivos controles 1g (B, D).

TABLA 4. Resumen de los resultados obtenidos con la línea CYCB1;1 crecida a mayor concentración de sacarosa en el Levitador magnético					
Parámetros		Días crecimiento	0g*	1g*	2g*
Longitud de las plántulas	Control 1g	2d	=	+	=
	Control 1g*		=		=
	Control 1g	4d	=	=	=
	Control 1g*		=		=
Tasa de proliferación celular	Control 1g	2d	=	--	-
	Control 1g*		++		+
	Control 1g	4d	++	=	=
	Control 1g*		++		=
Expresión de ciclina B1	Control 1g	2d	=	=	=
	Control 1g*		=		=
	Control 1g	4d	--	=	--
	Control 1g*		=		=
Biogénesis de ribosomas (Tamaño nucleolar)	Control 1g	2d	+	+	++
	Control 1g*		=		+
	Control 1g	4d	--	=	-
	Control 1g*		-		=
<p>Diferencias: ++/-- fuertes +/- leves = sin diferencias <u>En verde</u>: se muestran resultados diferentes a los encontrados en el experimento realizado con concentraciones estándar de sacarosa en el medio.</p>					

4. Estudio sistemático de la distribución de auxinas con la línea transgénica *DR5:uidA* en todos los simuladores de gravedad alterada utilizados

El transporte polar de auxinas es una pieza central en la respuesta gravitrópica y en la proliferación celular de la raíz en *Arabidopsis thaliana*. Está demostrado que la transducción del estímulo gravitatorio, sea en condiciones de gravedad terrestre o de gravedad alterada, resulta en modificaciones en el transporte polar de auxinas (Casimiro *et al.*, 2001). Además, esta hormona es un regulador esencial de los procesos de proliferación y crecimiento celular; en concreto, de los niveles de auxinas depende la coordinación entre estos dos procesos celulares que es la base de la denominada “competencia meristemática” que caracteriza a estos tejidos de la planta (Teale *et al.*, 2006).

Estas razones justifican la importancia de llevar a cabo un estudio sobre la distribución de auxinas en el extremo de la raíz en condiciones de gravedad alterada. Para ello, utilizamos la línea transgénica *DR5:uidA*. El promotor DR5 es sintético y contiene un elemento de respuesta a auxinas (ARE; Casimiro *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2006). La construcción *DR5:uidA* permite estudiar fácilmente el patrón de distribución de auxinas, observando qué zonas y qué tipos celulares son teñidos en azul por la tinción histoquímica de la β -glucuronidasa. Crecimos plántulas de la línea *DR5:uidA* durante 4 días en las mismas condiciones de gravedad alterada que utilizamos en los experimentos con la línea *CYCB1:uidA*. Se hicieron tres experimentos: uno en el Levitador magnético de Nottingham (UK) y otros dos, simultáneamente, en la RPM y la LDC. Los diseños experimentales se describen en las Figuras 53 y 54.

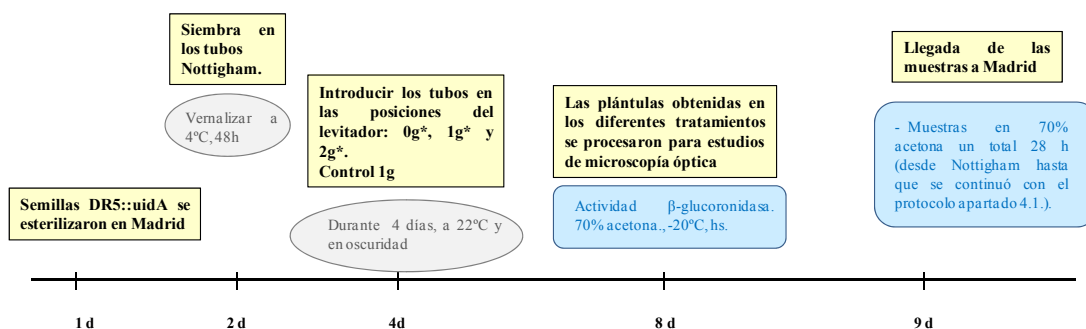


Figura 53. Diseño experimental con la línea transgénica *DR5:uidA* en el Levitador magnético (Nottingham).

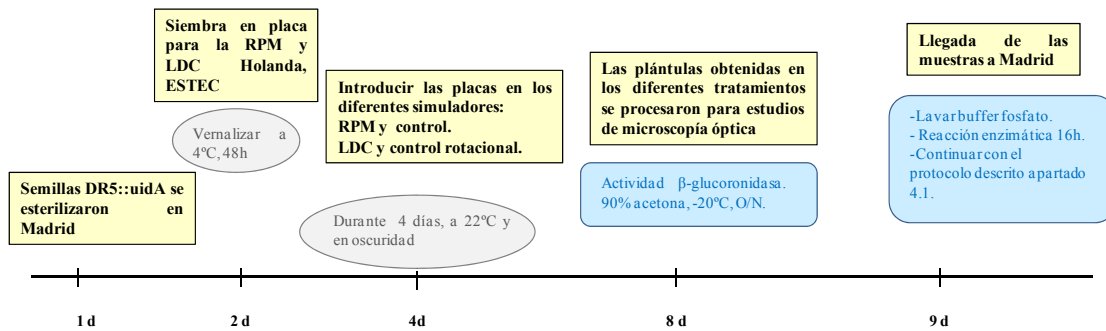
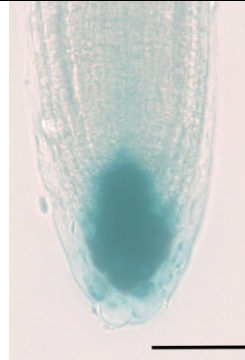
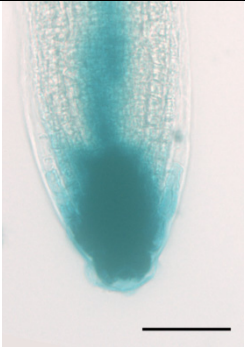
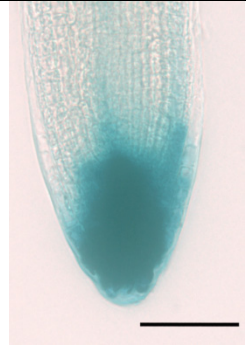
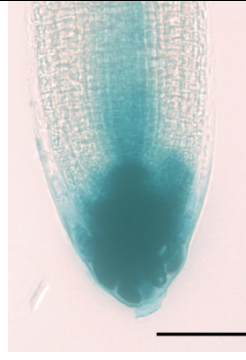


Figura 54. Diseño experimental con la línea transgénica DR5::uidA en la RPM y LDC (ESA-ESTEC).

4.1. Patrón de distribución de auxinas en el extremo de la raíz en condiciones de gravedad alterada

En condiciones normales de gravedad terrestre y en una muestra con genotipo salvaje (wt) las auxinas se localizan mediante la tinción histoquímica GUS en el extremo de la raíz, desde el centro quiescente hasta todas las células que conforman la columela. Al estudiar el patrón de distribución de las muestras crecidas en el Levitador magnético encontramos que en todos los casos se producían alteraciones en la distribución de las auxinas, extendiéndose no sólo por la columela, sino también por las capas laterales, algunas células meristemáticas y parte de la estela (Figura 55).

Cuando analizamos las muestras sometidas a simuladores inerciales, encontramos que el patrón de distribución también se encontraba alterado de forma similar en la RPM (Figura 55). Sin embargo en las muestras sometidas a 2g, en la Centrífuga, el patrón de distribución era similar al control, no detectándose alteraciones en la redistribución de la hormona (Figura 55).

Levitador Magnético				
Condición	Control 1g externo	0 g*	1g*	2g*
Patrón de tinción DR5-GUS				
Transporte Polar de Auxinas	Normal	Inhibido	Inhibido	Inhibido


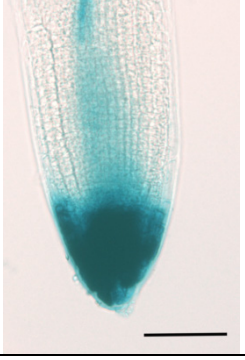
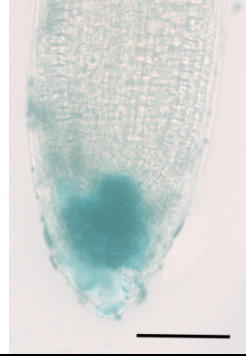
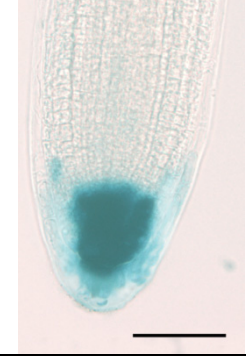
Condición	RPM		LDC	
	Control 1g externo	RPM (0 g)	Control 1g externo	2g
Patrón de tinción DR5-GUS				
Transporte Polar de Auxinas	Normal	Inhibido	Normal	Normal

Figura 55. Expresión de DR5:uidA en meristemos radiculares de muestras crecidas durante 4 días, en diferentes simuladores de gravedad alterada. El patrón de tinción revela el estado funcional del proceso de Transporte Polar de Auxinas.

4.2. Cuantificación de la distribución de auxinas en el extremo de la raíz en condiciones de gravedad alterada

La cantidad de hormona acumulada en las diferentes zonas del meristemo radicular fue cuantificada indirectamente por la D.O.I. de las zonas teñidas en azul. En todas las muestras del Levitador magnético había un aumento de hormona en el meristemo radicular con respecto al control (Figura 56). Este aumento es normal debido a que el área por donde se extiende la auxina es mayor que en el control 1g, como hemos descrito anteriormente.

La cantidad de auxina en el meristemo radicular también era mayor al comparar las muestras sometidas a microgravedad simulada en la RPM con su control (Figura 56). Sin embargo en el caso de la Centrifuga 2g no se observó una mayor acumulación, en la cantidad de hormona en el meristemo radicular (Figura 56).

Estos datos nos indican que la microgravedad simulada provoca alteraciones en la distribución de auxinas, como se pudo observar en la RPM y 0g*, al igual que el campo magnético (1g*). En el tratamiento 0g* del Levitador, el efecto de la microgravedad estaría enmascarado por el efecto del campo magnético, dando como resultado un mismo patrón en la alteración de la distribución de la hormona. La hipergravedad 2g (LDC) no causa ningún cambio en el transporte polar de auxinas; por lo tanto, los cambios observados en la condición 2g* del Levitador se pueden asociar al efecto del campo magnético.

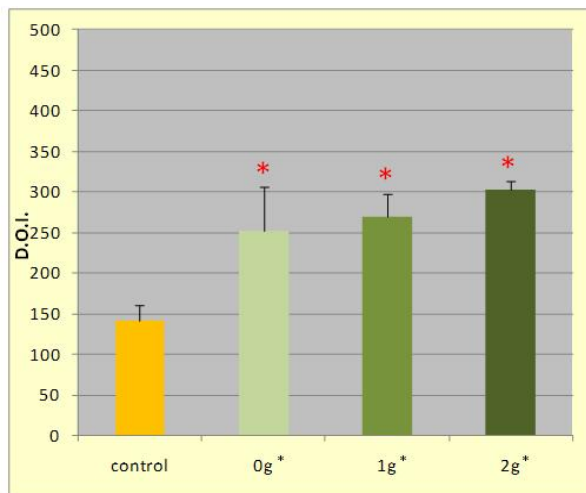
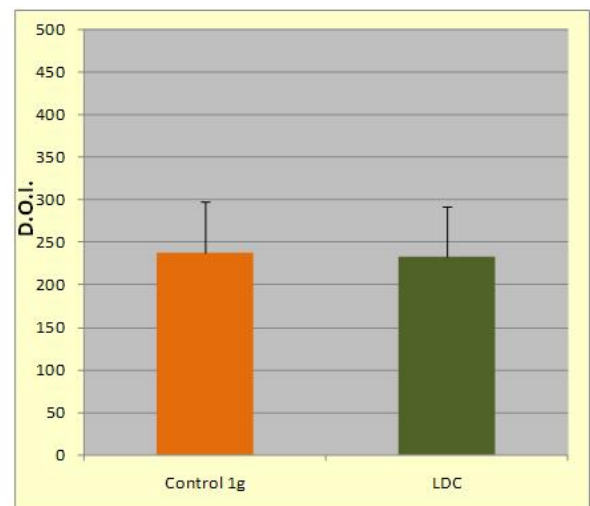
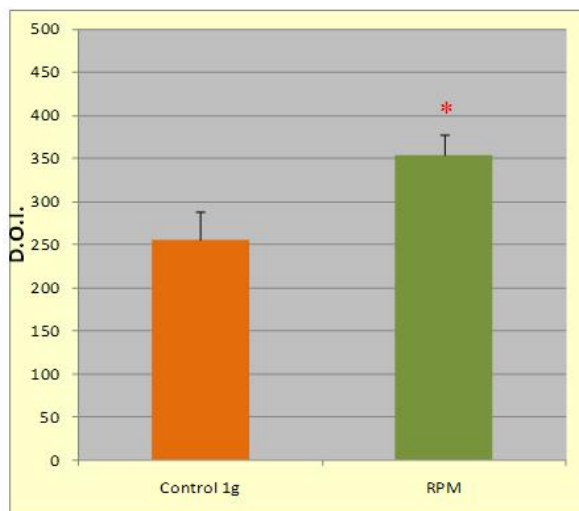


Figura 56. Expresión de DR5 en meristemos radiculares en muestras sometidas a diferentes simuladores de gravedad alterada, durante 4 días de crecimiento. Se cuantifica la expresión mediante la D.O.I de la actividad β -glucuronidasa.

Diferencias significativas $p < 0,05$ (*).



RESULTADOS

SEGUNDA PARTE: Estrategias para el estudio a nivel molecular de la proliferación y el crecimiento celular con plántulas completas en gravedad alterada

5. Estudios genéticos a nivel de plántula entera en el levitador magnético (Nottingham, UK)

6. Obtención de plantas transgénicas con las construcciones CYCB1:GFP y AtNUC-L1:GFP

Segunda parte: Estrategias para el estudio a nivel molecular de la proliferación y el crecimiento celular con plántulas completas en gravedad alterada

5. Estudios genéticos a nivel de plántula entera en el levitador magnético (Nottingham, UK)

Con el objetivo de poder ampliar nuestro estudio a cualquier gen relacionado con la proliferación y el crecimiento de *Arabidopsis*, decidimos utilizar PCR cuantitativa con cebadores específicos. Este estudio a nivel de plántula completa se inició evaluando el nivel de expresión de ciclina B1 y de nucleolina L1 en muestras sometidas al campo magnético en las distintas posiciones del Levitador, puesto que estos dos genes son claves para nuestro sistema. El experimento requirió 5 rondas para obtener suficiente cantidad de material biológico (unas 20 plántulas crecidas durante 4 días por ronda en cada posición para extraer RNA en 3 replicas biológicas). Es necesario destacar que la zona meristemática de la raíz de *Arabidopsis* está formada por muy poca cantidad de células, insuficientes para el estudio genómico, por lo que, necesariamente, el experimento se tuvo que hacer con plántulas enteras.

Como gen endógeno para normalizar los resultados relativos de expresión cuantitativos se utilizó un gen constitutivo de actina (*ACT-7*) para el que se comprobó previamente que no existían diferencias de expresión para ninguno de los tratamientos.

5.1. Resultados de PCRq

5.1.1. Expresión de AtNucL1

La expresión de la nucleolina L1 se vio aumentada significativamente ($p < 0,05$) en muestras sometidas al campo magnético, tanto en la posición 0g* como en la 1g* con respecto al control externo (Figura 57). Por el contrario, la expresión de nucleolina en muestras sometidas a hipergravedad simulada (2g*) se encontró disminuida

ligeramente frente al control externo, y de forma muy significativa si la comparamos con el control interno 1g* sometido a fuerte campo magnético.

Los datos de expresión cuantitativa de nucleolina en la plántula entera no se corresponden con los obtenidos al cuantificar la cantidad de proteína en el nucleolo de células meristemáticas de raíz (Figura 38 y 39, primera parte de resultados), aunque ambos parámetros son indicadores de biogénesis de ribosomas (Cerdido y Medina, 1995; Medina *et al.*, 2000). Unos resultados no son necesariamente contradictorios con los otros, considerando que en inmunocitoquímica estamos cuantificando proteína en una estructura celular concreta, y no expresión génica a nivel de plántula completa (donde la representación meristemática es muy reducida), como en la PCRq.

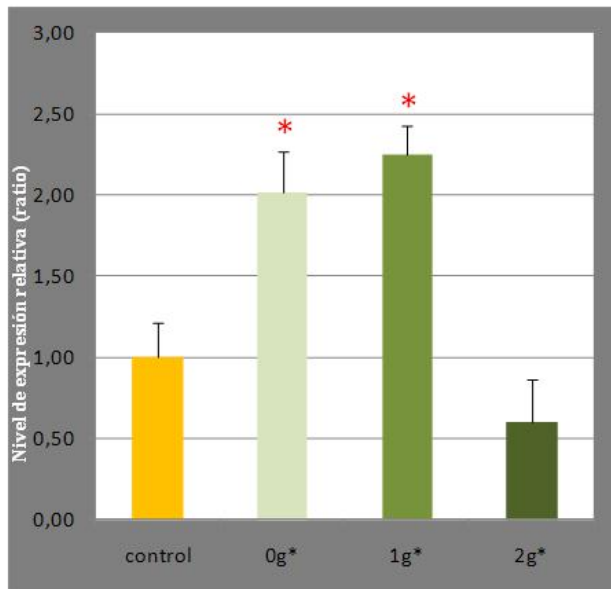


Figura 57. PCRq de la expresión de nucleolina L1 en muestras sometidas a Levitación magnética durante 4 días. Existe un aumento significativo de expresión en muestras sometidas al campo magnético y a la posición 0g*, con respecto al control. Por el contrario se observó una disminución en las condiciones de hipergravedad simulada.

Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

5.1.2. Expresión de *CYCBI;1*

La expresión del gen de la ciclina B1 se encontró aumentada en la posición 1g* del Levitador, indicando que a nivel de plántula completa, el campo magnético modifica la expresión de este gen (Figura 58). Un aumento de expresión similar fue observado en el tratamiento de hipergravedad simulada (2g*), pero no en microgravedad simulada (aunque se observa una disminución significativa si comparamos el tratamiento 0g* con el control interno 1g*).

Estos resultados a nivel de plántula entera son de nuevo diferentes a los obtenidos midiendo la expresión de la β -glucuronidasa en el meristemo radicular (Figura 33, primera parte de resultados), donde la expresión de ciclina B1, disminuía en todas las muestras sometidas al campo magnético, potenciándose más esta disminución en muestras que además estaban expuestas a gravedad alterada.

Para aclarar la aparente contradicción entre estos datos evaluamos la expresión de la β -glucuronidasa en plántulas completas. Como se observa en la Figura 59, aunque la expresión de la ciclina (por GUS) es muy alta en los meristemos radiculares, se localiza también en los cotiledones (mucho más masivos) y en los inicios de raíces secundarias. Se cuantificó la D.O.I en los cotiledones y los resultados encontrados son similares a los de la PCRq (Figura 60). La concordancia entre la expresión de la β -glucuronidasa en los cotiledones y los resultados de PCRq se deben a que el área que representa los cotiledones comparado con el resto de zonas coloreadas es mucho mayor. Se observó un ligero aumento de expresión en $0g^*$ y un mayor aumento en el tratamiento de hipergravedad simulada al cuantificar D.O.I. Sin embargo la expresión del control interno no se vio aumentada en los cotiledones con respecto al control externo, a diferencia de lo que ocurrió a nivel de plántula entera por PCRq.

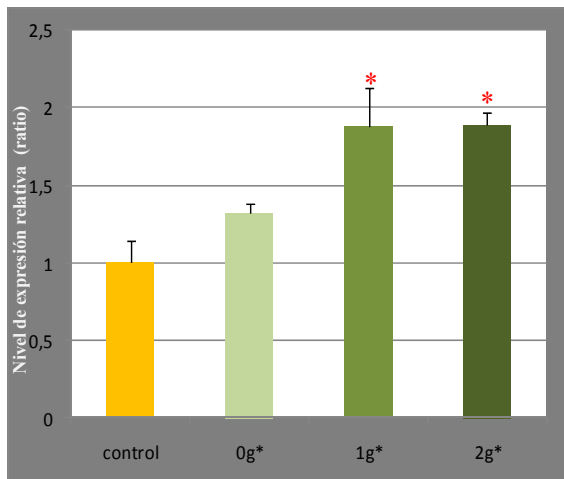


Figura 58. PCRq de la expresión de ciclina B1 en muestras sometidas a Levitación magnética durante 4 días. Existe un aumento significativo de expresión en muestras sometidas al campo magnético y a la posición $2g^*$, con respecto al control externo. Se produce una disminución en la expresión en condiciones de microgravedad simulada al compararse con el control interno $1g^*$ (aunque no se representa en la figura el nivel de significación).

Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

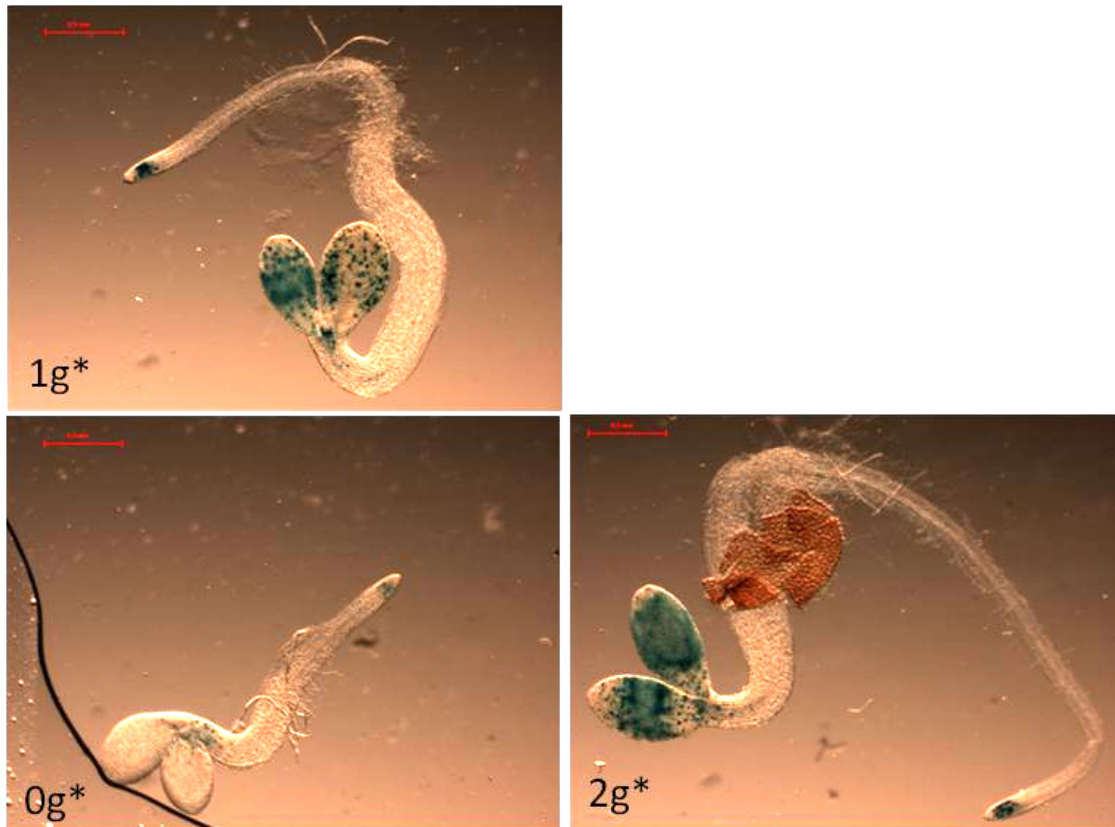


Figura 59. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* con la construcción *CYCB1: uidA* crecidas durante 2 días en el Levitador. Distribución de la expresión de ciclina B1 en plántulas enteras. Las muestras con cuatro días de crecimiento muestran el mismo patrón en la distribución de la ciclina B1, aunque son más largas.

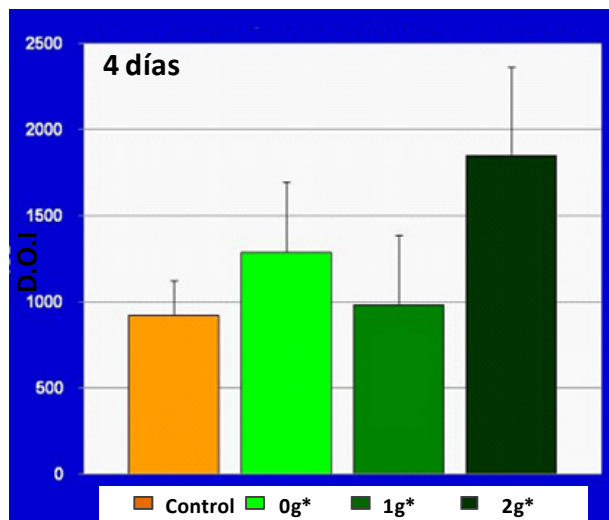


Figura 60. Cuantificación de la expresión de ciclina B1 (D.O.I.) en los cotiledones de las diferentes muestras sometidas a las distintas condiciones del Levitador magnético con 4 días de crecimiento.

6. Obtención de plantas transgénicas con las construcciones *CYCB1:GFP* y *AtNUC-L1:GFP*

Considerando las complicaciones técnicas (fijadores, solución de revelado) para evaluar *in situ* la expresión génica de ciclina B1 y nucleolina L1 con el gen reportero GUS, en experimentos en gravedad alterada, real o simulada, decidimos generar plantas transgénicas que expresen la proteína fluorescente GFP bajo el promotor específico de estos genes. Estas construcciones son de muy alto interés para el laboratorio por su utilización en futuros experimentos en Tierra y también en experimentos espaciales que incluyan teleciencia (posibilidad de evaluar la expresión génica en tiempo real), debido a su rápida evaluación de los resultados a través de microscopía de fluorescencia. Para estimar cuál es la región promotora en nuestros genes, utilizamos como referencia los artículos donde se describen estos promotores en la construcción genética *CYCB1:uidA* (Ferreira *et al.*, 1994) y la construcción genética *AtNUC-L1:uidA* (Pontvianne *et al.*, 2007).

6.1. Construcción *CYCB1:GFP*

La región intergénica que separa el gen de la ciclina B1;1(AT4G37490,1) y el gen inmediatamente anterior en 5' tiene una longitud de 1128 pb y debería contener la mayor parte si no todos los elementos del promotor transcripcional de nuestro gen de interés, siendo una región similar a la utilizada por Ferreira *et al.* (1994) para la construcción *CYCB1:uidA*.

Para que la región promotora de 1128 pb estuviese flanqueada por las dianas de restricción que nos interesaban (compatibles con ambos plásmidos, pGEM-T Easy y pBIN 35S-mGFP4), teníamos que introducir estas modificaciones en la secuencia de DNA amplificado. Para ello diseñamos unos oligonucleótidos cebadores para PCR, incluyendo en los extremos el sitio de corte de las enzimas de restricción HindIII y BamHI (Figura 61). Por amplificación en una PCR preparativa pudimos obtener el ADN recombinante con esas secuencias promotoras modificadas genéticamente en los

extremos. Concretamente para la construcción *CYC1:uidA* pudimos utilizar una diana presente en el propio promotor, que se encontraba en el extremo 5' de la secuencia promotora, la diana HindIII. Únicamente tuvimos que modificar la secuencia del otro extremo para incluir la diana de la enzima BamHI. De este modo obtuvimos el plásmido binario necesario para realizar la agroinfiltración de nuestra construcción por inmersión floral de *Arabidopsis thaliana* (Figura 61).

A)

Primer ciclina B1;1: GFP(for)

5 AGGTAGTGAATGCTGAGATT 3

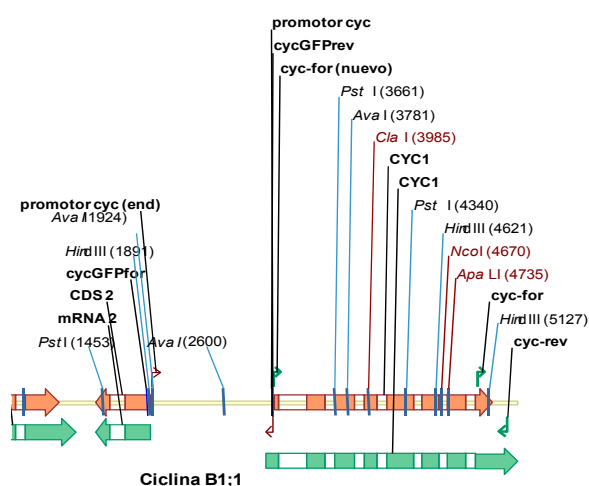
Secuencia	5 AGGTAGTGAATGCTGAGATTCCAAGGAAGCTTCATCT	CTGAGAGAAAGAGAAGAGAACTAAGATGATGAC 3
DNA genómico	3 TCCATCACGTTACGACTCTAAAGGTTCCATCGAAGTAGA	GACTCTCTTCTCTCTCTTGAGATTCTACTACTG 5

HindIII

3 TCTTCTCTCTCTGTGATTCTA
CCTAGG 5
BamHI

Primer ciclina B1;1: GFP(rev)

B)



C)

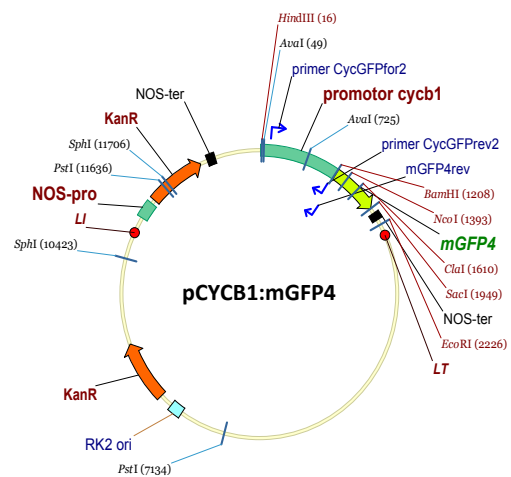


Figura 61. Diseño de la construcción CyCB1:mGFP4. A) Detalle de las secuencias flanqueantes del amplicón con los cebadores y los sitios de corte de las enzimas de restricción empleadas. B) Mapa de restricción del gen Ciclina B1 (utilizando el programa Vector NTI 9.0.0 (2003)) y de su región promotora, como del RNAm (flecha verde). También se representa la localización de los cebadores diseñados y de los sitios de corte para enzimas de restricción disponibles en el laboratorio. C) Mapa de la construcción del plásmido binario pCYCB1:mGFP4. Formada por las secuencias descritas anteriormente en el apartado 2.2 de Material y métodos, pero en vez de la secuencia promotora 35S, lleva la secuencia del promotor del gen ciclina B1; 1.

6.2. Construcción AtNUC-L1:GFP

Aunque la región promotora del gen nucleolina L1 (AT1G48920,1) puede incluir un amplio rango del genoma entre la región transcrita del gen nucleolina y el gen situado en 5', ya que existe una amplia región intergénica entre ellos, decidimos utilizar un fragmento de 1197 bp similar al empleado en la construcción *AtNUC-L1:uidA* (Pontvianne *et al.*, 2007; Figura 62). En este caso fue necesario introducir la diana de restricción por PCR convencional en ambos extremos de la secuencia promotora para permitir su clonación en el plásmido binario y posterior agroinfiltración en *Arabidopsis* (Figura 62).

A)

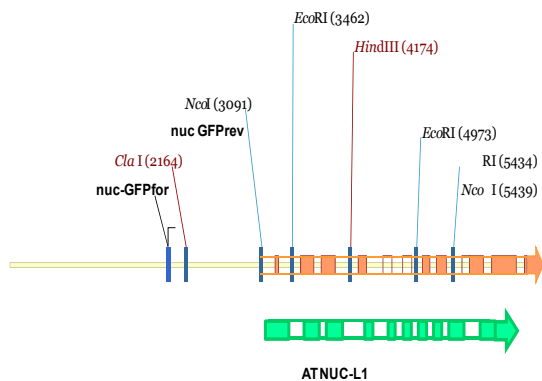
Primer nucl1: GFP(for)

5 TAACCAAGTCAAGTCAAGCTTGAATATATGTT 3

Secuencia	5 TAACCAAGTCAAGTCAAGCTTGAATATATGTT	TCTCTTTCTCAGTTCATGCGGAAAG 3
DNA genómico	3 ATTGGTTCAGTTCAGTTAGGAACCTTATATACAA	AGAGAAAGAGTCAAGAGGTACTACTG 5
	HindIII		3 AGAGAAAGAGTCAAGAGGTAC CCTAGG 5 BamHI

Primer nucl1: GFP(rev)

B)



C)

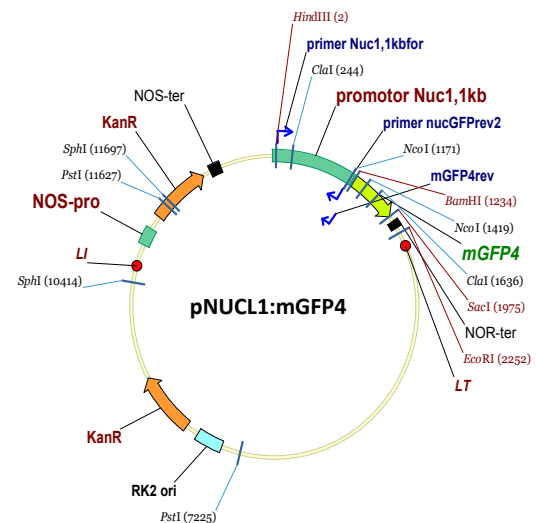


Figura 62. Diseño de la construcción Nucl1:mGFP4. A) Detalle de las secuencias flanqueantes del amplicón con los cebadores y los sitios de corte de las enzimas de restricción empleadas B) Mapa de restricción del gen AtNUC-L1 (utilizando el programa Vector NTI 9.0,0 (2003)) y de su región promotora, como del RNAm (flecha verde). También se representa la localización de los cebadores diseñados y de los sitios de corte para enzimas de restricción disponibles en el laboratorio. C) Mapa de la construcción del plásmido binario pNUCL1:mGFP4. Formada por las secuencias descritas anteriormente en el apartado 2.2 de Material y métodos, pero en vez de la secuencia promotora 35S, lleva la secuencia del promotor del gen AtNUC-L1.

6.3. Selección de las plantas transgénicas

Una vez completados los protocolos de generación de estos dos tipos de plantas transgénicas, seleccionamos en placa con resistencia a kanamicina para la obtención de plantas resistentes. Seleccionamos 15 plantas que presentaban resistencia de cada construcción genética, las trasplantamos a tierra y confirmamos por PCR convencional que realmente eran transgénicas. Estudiamos la descendencia de las plantas seleccionadas y encontramos, como era de esperar, que algunas de ellas tenían descendencia $\frac{3}{4}$ $\frac{1}{4}$ ($\frac{3}{4}$ de las plantas sobrevivían, por llevar insertado el transgén, y $\frac{1}{4}$ morían). Estas plantas heterocigotas eran las que nos interesaban para obtener la homocigosidad, por lo que continuamos estudiando su descendencia, para encontrar finalmente plantas que fueran homocigotas, y por tanto, toda su descendencia fuera resistente a kanamicina.

6.3.1. Evaluación de la expresión de GFP en ambas construcciones por microscopía confocal

Analizamos por microscopía confocal la expresión de nuestras plantas transgénicas homocigotas, en diferentes partes de la plántula (meristemo radicular, epicotilos radiculares y cotiledones), comprobando que se expresaban en los mismos tejidos que la construcciones “GUS”, y utilizamos como control negativo plántulas del fenotipo silvestre “wt” (Figuras 63, 64, 65 y 66). La construcción de las líneas GFP, tiene la misma función que las líneas “GUS”, pero son más fáciles de evaluar, permitiéndonos estudiar más detalladamente la expresión de estos promotores en las capas celulares, debido a que el microscopio confocal es capaz de obtener cortes virtuales a lo largo del eje Z (Figuras 67 y 68). Para la mejor visualización de la GFP, las muestras se fijaron en PFA 4% durante 30 minutos, sucesivamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y finalmente se montaron sobre portaobjetos en agua.

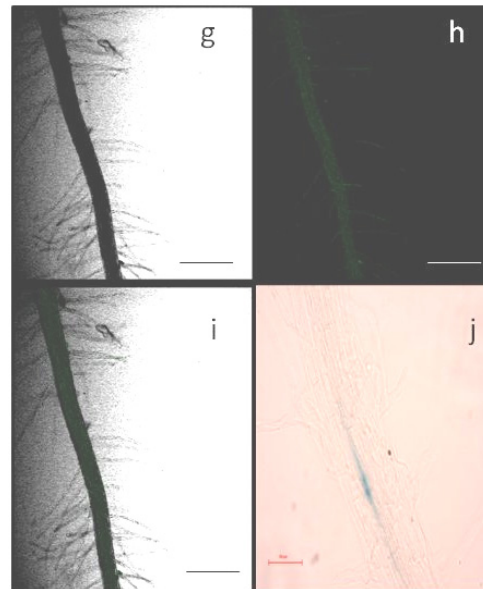
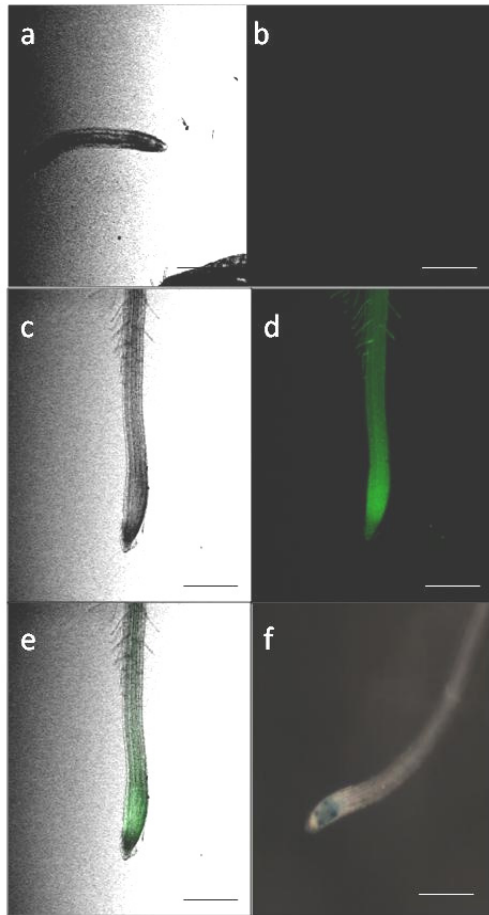


Figura 63. Plántulas con la construcción CYCB1:GFP con 4 días de crecimiento comparadas con CYCB1:uidA y WT como control. Las barras indican 0,5 mm.

a-f: Meristemos radiculares. a, c: Microscopía de contraste de fase. b, d: Microscopía confocal. a, b: Plántulas WT; c, d, e: Construcción CYCB1:GFP. e: superposición de c) y d). f: Microscopía de campo claro. Construcción CYCB1:uidA.
g-j: Epicotilos. g, h, i: Construcción CYCB1:GFP. g: Microscopía de contraste de fase; h: Microscopía confocal i: Superposición de g) y h). j: Microscopía de campo claro. Construcción CYCB1:uidA.

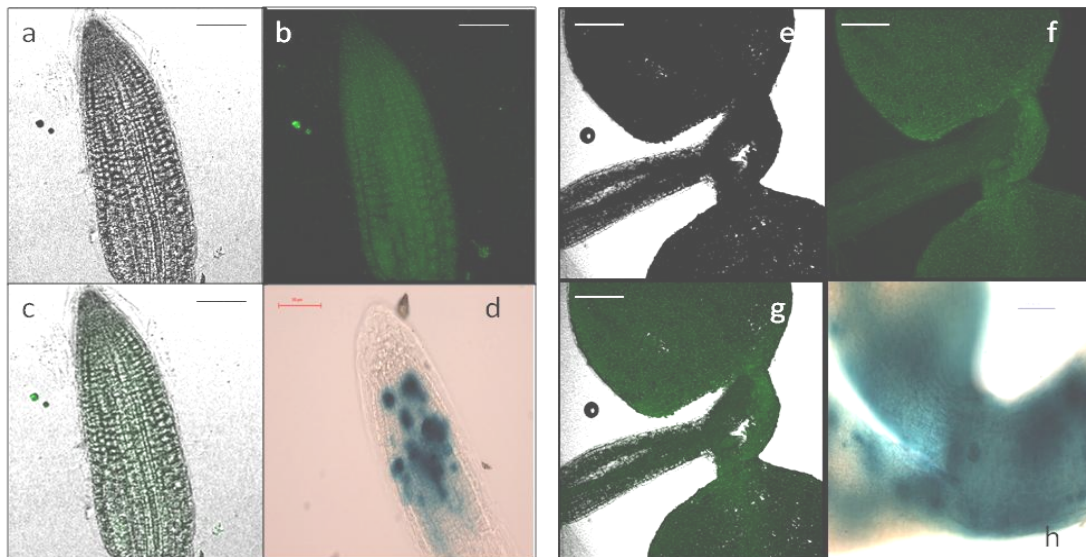


Figura 64. Plántulas con la construcción CYCB1:GFP con 4 días de crecimiento, comparadas con la construcción CYCB1:uidA, observadas a mayor aumento. Las barras indican 50 μ m.

a-d: Meristemos radiculares. a) Microscopía de contraste de fase; construcción CYCB1:GFP. b) Microscopía confocal; construcción CYCB1:GFP. c) Superposición de a) y b). d) Microscopía de campo claro; construcción CYCB1:uidA. e-h: Cotiledones. e) Microscopía de contraste de fase; construcción CYCB1:GFP. f) Microscopía confocal; construcción CYCB1:GFP. g) Superposición de e) y f). h) Microscopía de campo claro; construcción CYCB1:uidA.

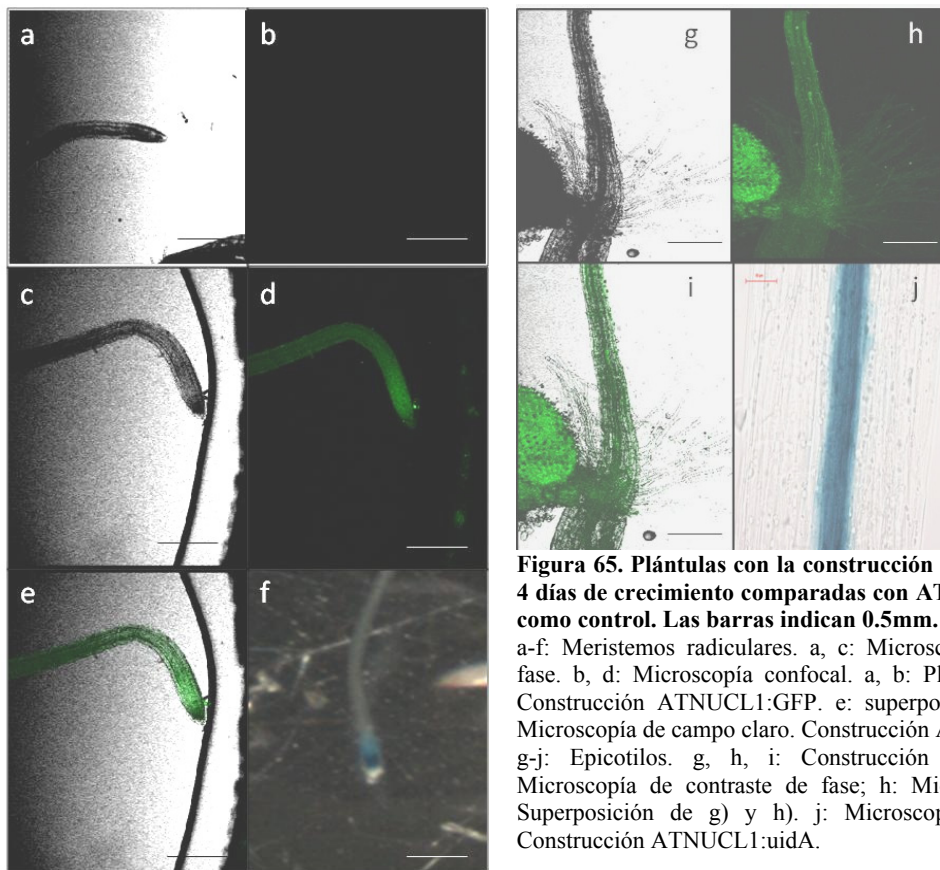


Figura 65. Plántulas con la construcción ATNUCL1:GFP con 4 días de crecimiento comparadas con ATNUCL1:uidA y WT como control. Las barras indican 0.5mm.

a-f: Meristemos radiculares. a, c: Microscopía de contraste de fase. b, d: Microscopía confocal. a, b: Plántulas WT; c, d, e: Construcción ATNUCL1:GFP. e: superposición de c) y d). f: Microscopía de campo claro. Construcción ATNUCL1:uidA. g-j: Epicotilos. g, h, i: Construcción ATNUCL1:GFP. g: Microscopía de contraste de fase; h: Microscopía confocal i: Superposición de g) y h). j: Microscopía de campo claro. Construcción ATNUCL1:uidA.

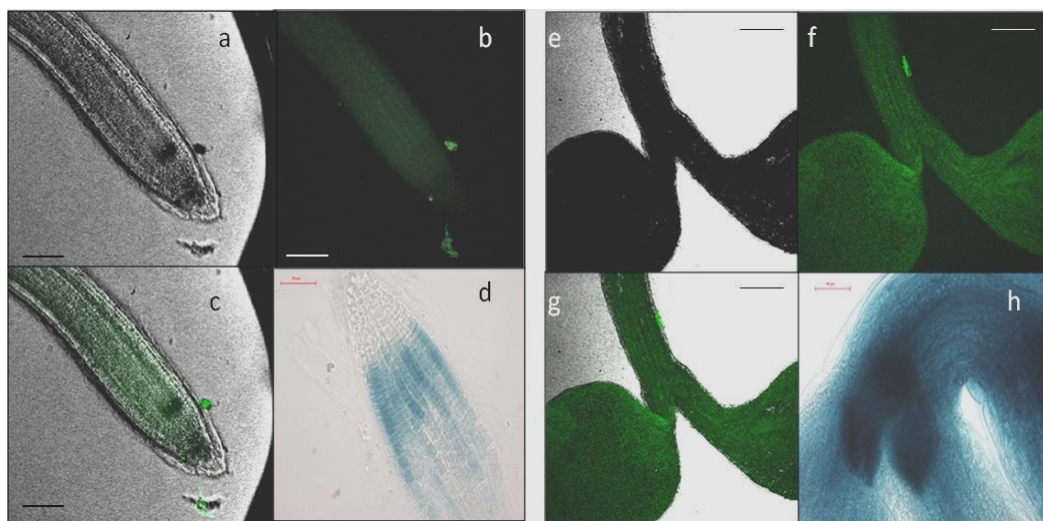


Figura 66. Plántulas con la construcción ATNUCL1:GFP con 4 días de crecimiento, comparadas con la construcción ATNUCL1:uidA, observadas a mayor aumento. Las barras indican 50μm.

a-d: Meristemos radiculares. a) Microscopía de contraste de fase; construcción ATNUCL1:GFP. b) Microscopía confocal; construcción ATNUCL1:GFP. c) Superposición de a) y b). d) Microscopía de campo claro; construcción ATNUCL1:uidA. e-h: Cotiledones. e) Microscopía de contraste de fase; construcción ATNUCL1:GFP. f) Microscopía confocal; construcción ATNUCL1:GFP. g) Superposición de e) y f). h) Microscopía de campo claro; construcción ATNUCL1:uidA.

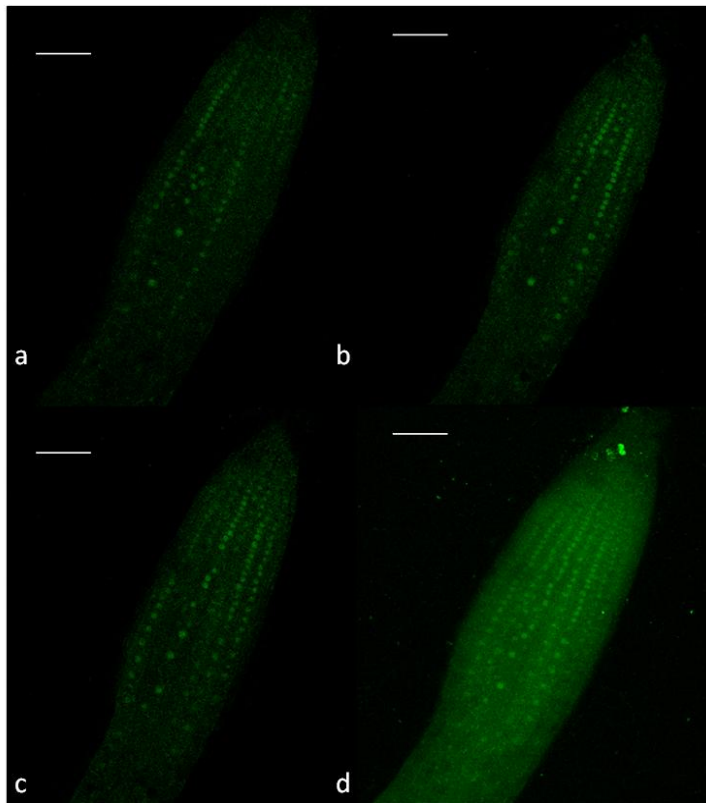


Figura 67. Microscopía confocal de plántulas de 4 días con la construcción CYCB1:GFP.
a, b, c: Cortes ópticos virtuales del meristemo radicular. d): Proyección máxima. Las barras indican 75 μ m.

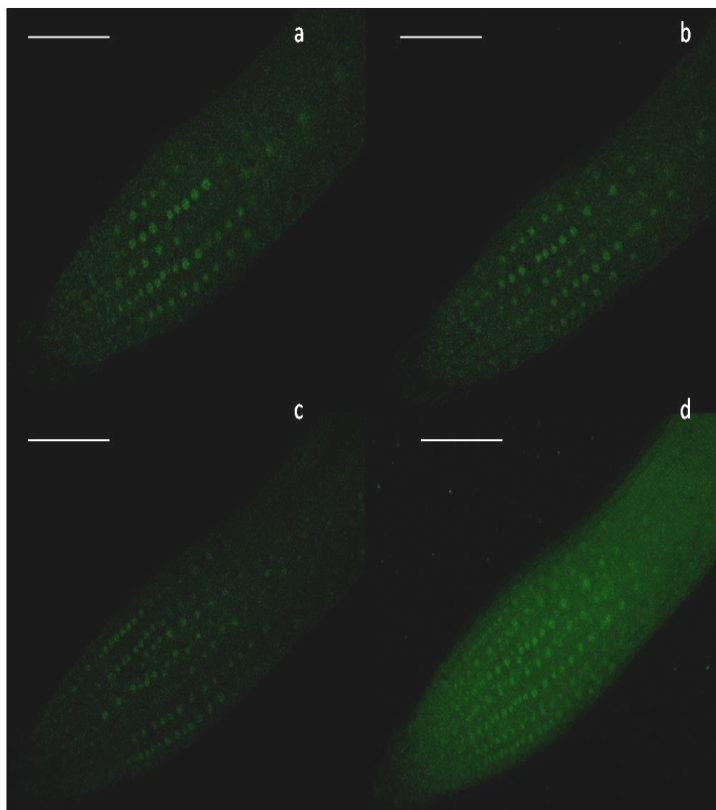


Figura 68. Microscopía confocal de plántulas de 4 días con la construcción AtNUCL1:GFP.
a, b, c: Cortes ópticos virtuales del meristemo radicular. d): Proyección máxima. Las barras indican 75 μ m.

RESULTADOS

TERCERA PARTE: Estudio a nivel molecular de la proliferación y el desarrollo celular en gravedad alterada con cultivos celulares sólidos in vitro (callos) de Arabidopsis thaliana

7. Estudios sobre el nucleolo y el ciclo celular con cultivos celulares sólidos *in vitro* (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada

8. Estudios genómicos con cultivos celulares sólidos *in vitro* (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada

9. Estudios proteómicos con cultivos celulares sólidos *in vitro* (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada

Tercera parte: Estudio a nivel molecular de la proliferación y el desarrollo celular en gravedad alterada con cultivos celulares sólidos *in vitro* (callos) de *Arabidopsis thaliana*

7. Estudios sobre el nucleolo y el ciclo celular con cultivos celulares sólidos *in vitro* (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada

Los experimentos descritos en los apartados anteriores (y otros previos surgidos de nuestro laboratorio) se realizaron utilizando plántulas de *Arabidopsis thaliana*, de las que se eligió el meristemo radicular como fuente de células en proliferación activa en las que estudiar los efectos de la gravedad alterada sobre los procesos de proliferación y crecimiento celular. Estos experimentos han producido resultados relevantes y es evidente que ni el tema de trabajo ni el material biológico se encuentran agotados, sino que permanecen abiertos numerosos problemas. Sin embargo, cuando se pretendió ampliar el abanico de técnicas experimentales para poder evaluar nuevos parámetros, y, específicamente, cuando se pretendió utilizar metodología avanzada de biología molecular (en concreto, genómica y proteómica) nos encontramos con el importante problema de la limitación cuantitativa del material biológico. En efecto, el meristemo radicular de *Arabidopsis thaliana* está compuesto por una cantidad de células que es claramente insuficiente para las extracciones de ácidos nucleicos y de proteínas que conllevan estas técnicas. A este respecto, es muy significativo el experimento de PCRq descrito en apartados anteriores en la que el resultado de la expresión de los genes objeto del experimento es contrario al obtenido con genes reporteros, debido a que el aporte cuantitativo del meristemo radicular a la biomasa de la plántula completa es claramente minoritario.

Ante esta situación, nos decidimos a utilizar un material alternativo con el que pudiésemos superar esta limitación. El sistema celular elegido fue el cultivo celular *in vitro* de la misma especie vegetal, y, en concreto, la línea MM2d, caracterizada por ser especialmente apropiada para estudios de ciclo celular (Menges y Murray, 2006). Originariamente, esta línea celular es un cultivo líquido en suspensión, lo cual planteaba

a su vez problemas al someter la suspensión celular a los dispositivos de simulación de microgravedad, por la existencia de fuerzas internas de flotación que podrían interferir con las propias del dispositivo, complicando así el cálculo de la gravedad efectiva a que están sometidas las células. Para obviar este nuevo inconveniente, optamos por utilizar la forma vegetal del callo resistente procedente de los cultivos celulares en suspensión. El callo vegetal es un objeto sólido, que se trató en los dispositivos generadores de gravedad alterada de la misma forma que se habían tratado las plántulas en los experimentos anteriores.

La característica más importante de un cultivo celular es que está formado únicamente por células individualizadas, que no forman tejidos, no están diferenciadas y se encuentran en estado proliferante. Por tanto, este sistema biológico alternativo permite la utilización de un abanico de técnicas moleculares que requieren una cantidad de material biológico proliferante imposible de obtener usando plántulas completas. Sin embargo, a la hora de interpretar los resultados obtenidos en este sistema debe tenerse en cuenta que en él están ausentes los mecanismos reguladores del crecimiento y del desarrollo que poseen los organismos como tales, los cuales, en el caso específico que nos ocupa, integran e incluyen los mecanismos de percepción de la gravedad por órganos especializados y de transducción de la señal mecánica a otros órganos de la planta, en concreto al meristemo y a la zona de transición de la raíz.

Desde el principio quedó claro que la utilización de este nuevo sistema biológico era un enriquecimiento para el laboratorio y no una sustitución. No se abandonaba, en ningún modo, el trabajo con plántulas, sino que se complementaba con el trabajo en cultivos celulares para obtener así resultados más completos y un conocimiento más general de los problemas que se pretendían abordar.

Sobre este nuevo sistema biológico, realizamos tres experimentos prácticamente simultáneos y en las mismas condiciones, utilizando el tipo de dispositivos generadores de gravedad alterada que ya se habían utilizado antes en el laboratorio, en el presente trabajo o en otros previos: uno basado en campo magnético (Levitador) y otros dos en fuerza mecánica (LDC y RPM). Es preciso mencionar que el Levitador magnético que se utilizó en estos experimentos fue distinto del utilizado en experimentos anteriores con plántulas. Nuestra participación en un proyecto del Programa de Instalaciones en

Tierra de la ESA nos permitió el acceso al dispositivo HFML de la Universidad de Nijmegen (Holanda), integrado a su vez en el Programa EuroMagnet II de la Unión Europea. Por otra parte, la intensidad del campo magnético y las condiciones experimentales del aparato de Nijmegen fueron muy similares a las del dispositivo de Nottingham utilizado anteriormente.

En todos los experimentos, los callos crecidos durante 7 días fueron expuestos a 3h 20 min de gravedad alterada como se describe a continuación (Figura 69):

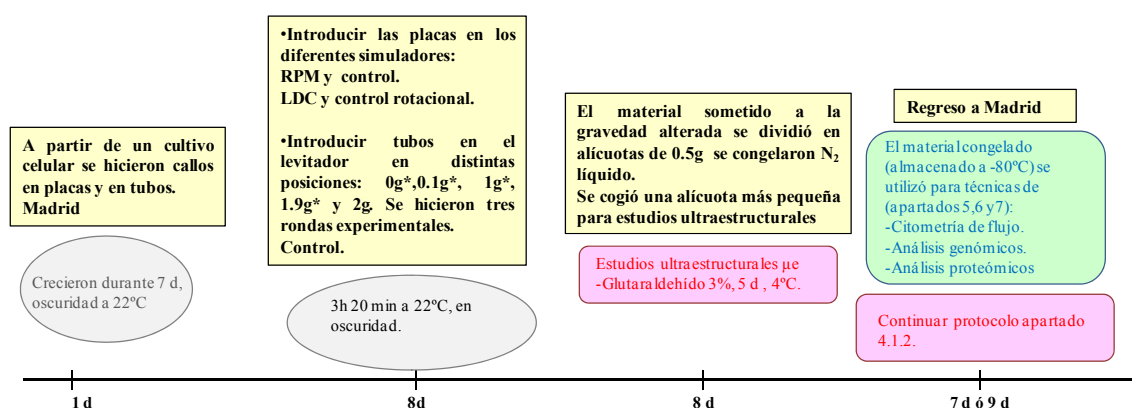


Figura 69. Diseño experimental con callos de *Arabidopsis thaliana* sometidos a diferentes simuladores de gravedad alterada (RPM, LDC y Levitador magnético (Nijmegen))

7.1. Estudios morfométricos y ultraestructurales del nucleolo

7.1.1. Tamaño nucleolar

El tamaño nucleolar fue medido en las células de callos incluidos en LRW, sobre cortes de 2 µm de espesor que se observaron por microscopía de contraste de fase. No se observaron diferencias significativas en el tamaño nucleolar al comparar cualquiera de las muestras del Levitador magnético con el control externo o con el control interno (1g*; Figura 70). Merece la pena destacar que en este caso se han utilizado 5 posiciones diferentes en el Levitador magnético. Sin embargo en el caso de los simuladores mecánicos se encontraron diferencias tanto en microgravedad simulada como en hipergravedad frente a sus respectivos controles (Figura 71). El tamaño se encontró disminuido en microgravedad simulada y aumentado en callos sometidos a hipergravedad (2g; Figura 71).

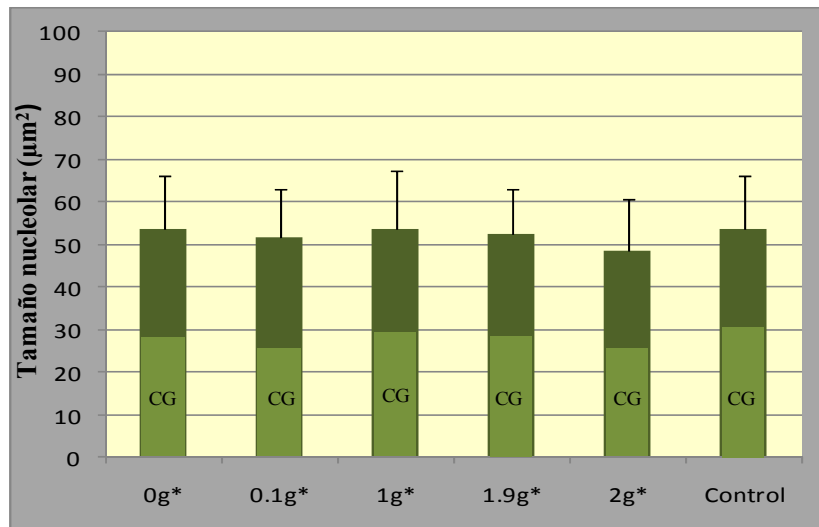


Figura 70. Tamaño nucleolar (μm^2) en las muestras sometidas al Levitador durante 3 h 20 minutos. No se observan diferencias significativas entre las muestras ni en el tamaño total ni el porcentaje de componente granular (CG).

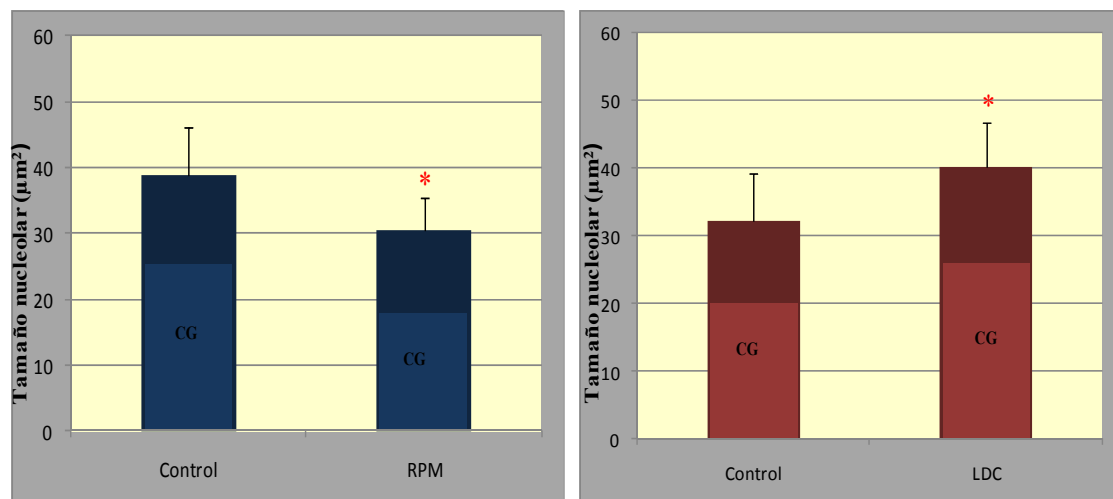


Figura 71. Tamaño nucleolar en las muestras sometidas a simuladores mecánicos (RPM, LDC) durante 3 h 20 minutos. La cuantificación del tamaño nucleolar y de sus componentes revelan diferencias significativas entre las muestras controles y sus respectivos tratamientos. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

7.1.2. Estudios estructurales a microscopía óptica y electrónica

Según nuestros datos, no existe hasta el momento información significativamente relevante sobre las propiedades morfofuncionales del nucleolo en cultivos celulares *in vitro* de *Arabidopsis*. Se hacía necesario, por tanto, realizar un estudio estructural para caracterizar la distribución de los subcomponentes nucleolares y definir modelos morfológicos que pudieran ser interpretados desde un punto de vista funcional, de acuerdo con la abundante información que posee nuestro laboratorio, plasmada en numerosas publicaciones durante un extenso período de tiempo (González-Camacho y Medina, 2005)

El estudio estructural se realizó sobre el material procedente de los experimentos realizados en los dos dispositivos de simulación mecánica: la RPM (microgravedad) y la LDC (hipergravedad 2g) y sus respectivos controles. La observación a microscopía electrónica de transmisión permitió clasificar los tipos morfológicos nucleolares detectados en tres modelos, que denominamos "vacuolado", "compacto" e "inactivo".

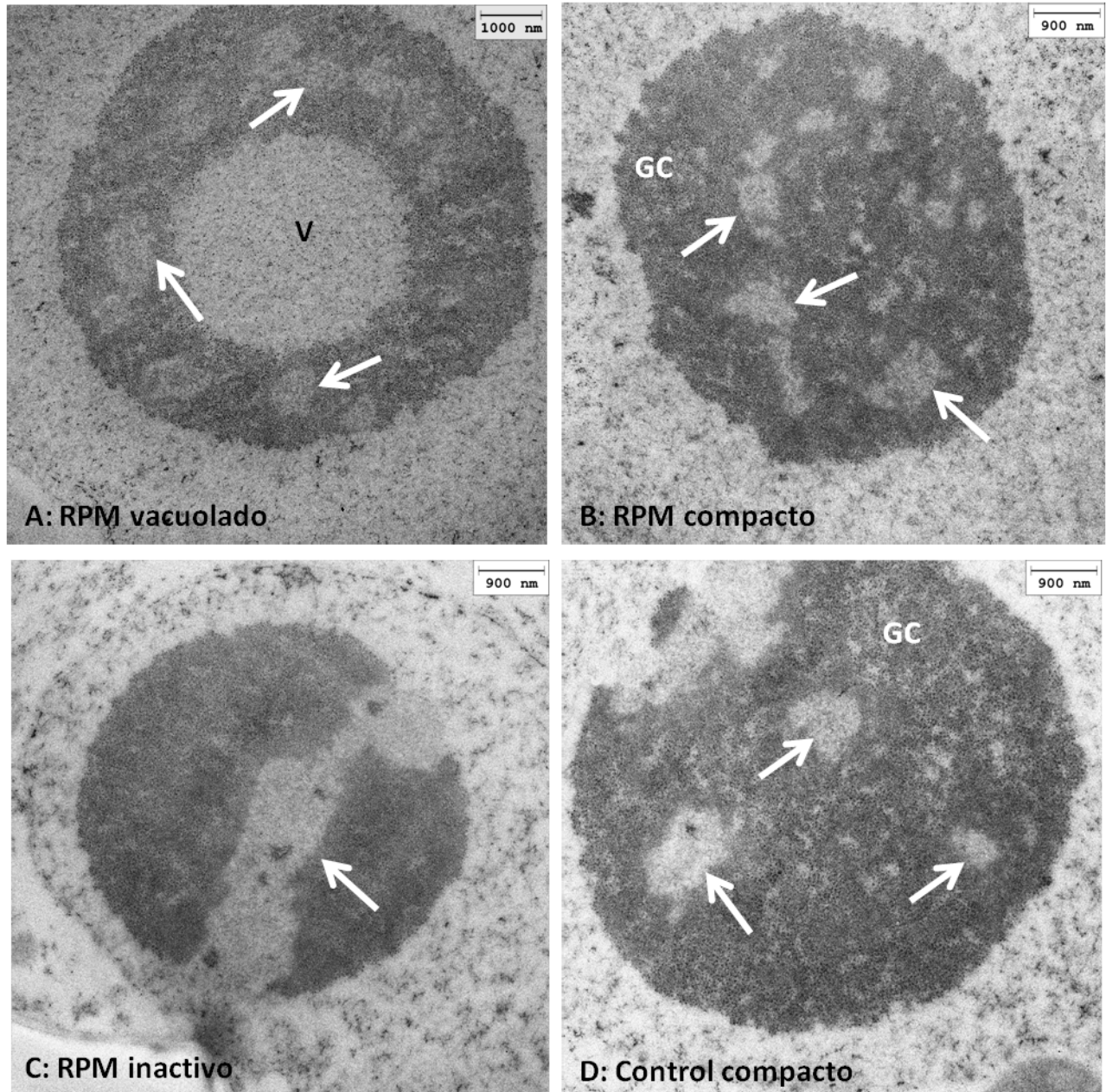


Figura 72. Tipos nucleolares observados a microscopía electrónica de transmisión en el experimento con cultivos celulares sólidos *in vitro* realizado en la RPM. A, B, C: Nucleolos de la muestra sometida a tratamiento en la RPM, en condiciones de microgravedad simulada. D: Nucleolo de la muestra control 1g. A: Nucleolo vacuolado. B, D: Nucleolos compactos. C: Nucleolo inactivo. Las flechas indican centros fibrilares. GC: Componente granular. V: "Vacuola" nucleolar.

En las Figuras 72 y 73 se muestran ejemplos representativos de estos tres modelos en los dos experimentos objeto del estudio, aunque es preciso hacer notar que no se trata de modelos estructurales rígidos y uniformes, sino que se pueden encontrar numerosas variantes y tipos morfológicos intermedios (véase, por ejemplo, la diferencia entre el nucleolo vacuolado mostrado en el experimento de la RPM (Figura 72) y el del experimento de la LDC (Figura 73)).

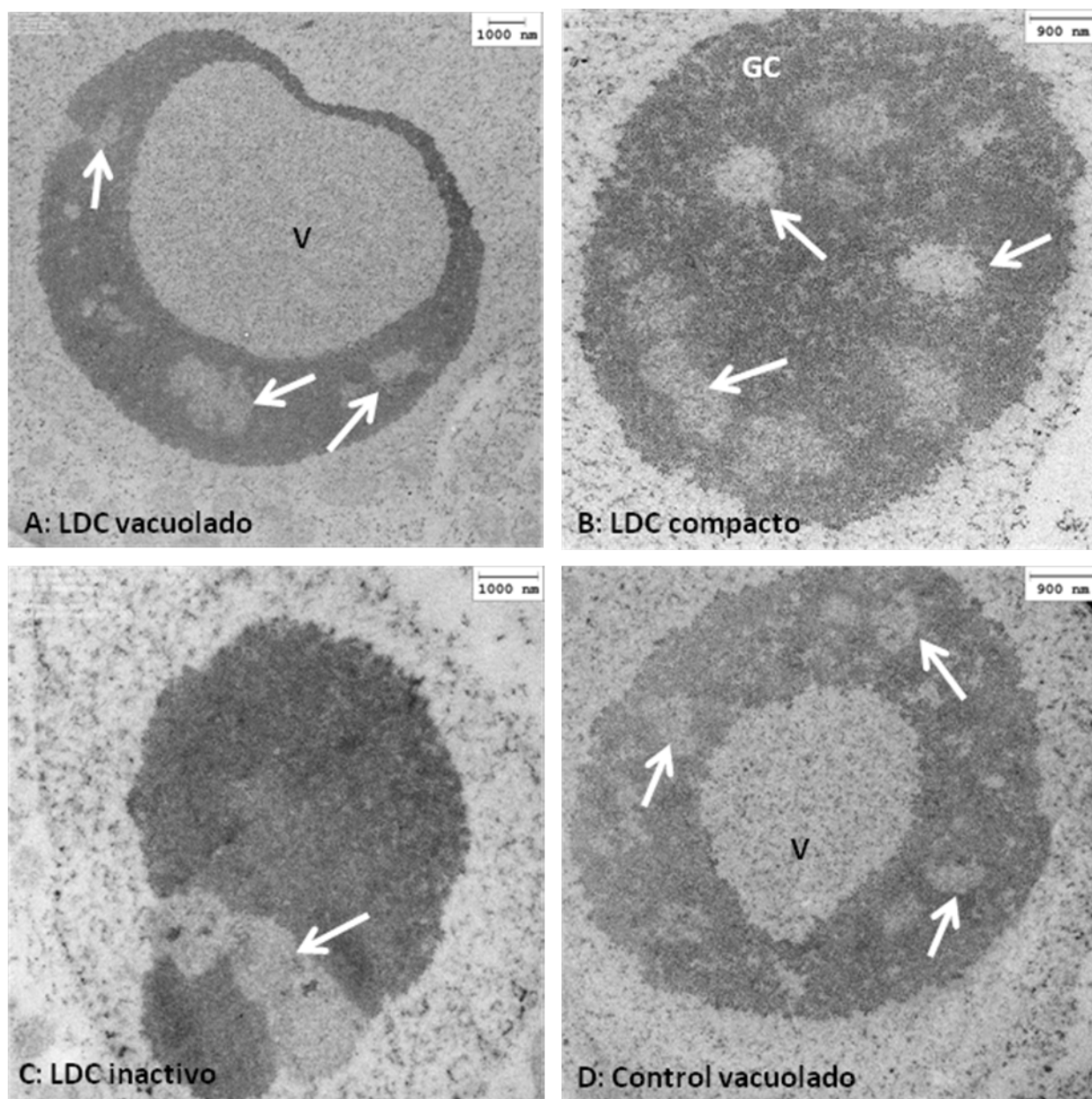


Figura 73. Tipos nucleolares observados a microscopía electrónica de transmisión en el experimento con cultivos celulares sólidos *in vitro* realizado en la LDC. A, B, C: Nucleolos de la muestra sometida a tratamiento en la LDC, en condiciones de hipergravedad (2g). D: Nucleolo de la muestra control 1g. A, D. Nucleolos vacuolados. B: Nucleolo compacto. C: Nucleolo inactivo. Las flechas indican centros fibrilares. GC: Componente granular. V: "Vacuola" nucleolar.

Los nucleolos vacuolados se caracterizan por la presencia de un gran espacio claro central o "vacuola nucleolar" que contiene gránulos similares a los del componente granular del nucleolo. En torno a la "vacuola" se dispone una "corteza" en la que se localizan centros fibrilares, componente fibrilar denso y más componente granular. Funcionalmente, los nucleolos vacuolados aparecen en células activamente proliferantes, con una elevada tasa de producción de precursores ribosómicos, es decir de transcripción de los genes del rRNA y de procesamiento del pre-rRNA (Risueño y Medina, 1986). Específicamente son típicos de células que se encuentran en el período G2 del ciclo celular, el más activo en la producción de ribosomas (González-Camacho y Medina, 2006).

Los "nucleolos compactos" presentan una estructura aparentemente más homogénea. Los espacios más claros que aparecen en su interior son centros fibrilares, zonas de anclaje y acumulación de la cromatina del DNA ribosómico, en los que se organiza el complejo de transcripción de la RNA polimerasa I (de Carcer y Medina, 1999). El número y el tamaño de los centros fibrilares está correlacionado con la actividad nucleolar. En torno a ellos, como consecuencia de la transcripción, se localiza el componente fibrilar denso y, en posición aún más exterior, el componente granular. Los nucleolos compactos aparecen en células proliferantes de actividad más o menos moderada de producción de ribosomas, correspondiente a los períodos G1 y S del ciclo celular. El grado de actividad nucleolar se manifiesta, además de en las características morfométricas de los centros fibrilares, en el propio tamaño nucleolar y en la proporción de componente granular, mayor cuanto más activo es el nucleolo (Sáez-Vásquez y Medina, 2008).

Finalmente, los "nucleolos inactivos" se caracterizan por la presencia de un único gran centro fibrilar, que puede visualizarse atravesando el nucleolo más o menos diametralmente. En su interior aparecen algunas pequeñas masas de cromatina condensada. La masa nucleolar es muy compacta, formada por componente fibrilar denso y componente granular entremezclados. El nombre, que define inequívocamente la ausencia de actividad de biogénesis de ribosomas en ellos, se debe a que fueron inicialmente descritos en raíces quiescentes de cebolla, cuyo estado de inactividad funcional es manifiesto, debido a la ausencia de agua. Con respecto al ciclo celular, las

células en las que aparecen se encuentran en el denominado "período G0", que supone la detención transitoria o definitiva, del progreso del ciclo celular, ya sea a partir de G1 o de G2 (Risueño y Medina, 1986). Es sorprendente la presencia de este tipo nucleolar en un cultivo *in vitro* de células proliferantes como el de nuestros experimentos. Podría corresponder a un inicio de apoptosis en determinadas zonas del cultivo, o en una detención de la proliferación celular, previa al comienzo de la diferenciación celular.

Observando a microscopía óptica de contraste de fase los cultivos celulares *in vitro* que se sometieron a los experimentos en la RPM y en la LDC pudimos constatar que los tipos nucleolares que habíamos podido identificar y describir con detalle a microscopía electrónica eran reconocibles con relativa facilidad a microscopía óptica (Figuras 74 y 75). Así pues, era posible realizar un estudio cuantitativo sobre los posibles cambios entre unos modelos y otros motivados por la alteración de la gravedad, puesto que a microscopía óptica podíamos cuantificar una población de células estadísticamente significativa. Así pues, midiendo entre 65 y 80 células de cada uno de los tratamientos y de sus correspondientes controles, pudimos demostrar que la alteración de la gravedad produce un cambio significativo en las características morfológicas del nucleolo que se correlacionan con la actividad de biogénesis de ribosomas. En concreto, bajo microgravedad simulada en la RPM, se produce una fuerte disminución de los nucleolos compactos y un aumento de los nucleolos inactivos, manteniéndose casi sin variación la proporción de nucleolos vacuolados respecto de los valores del experimento control (Figura 74). Este dato es coherente con la disminución de tamaño, descrita en el apartado anterior y puede interpretarse inequívocamente como una fuerte disminución de actividad como consecuencia del estrés gravitacional. Por el contrario, el efecto de la hipergravedad en la LDC es un ligero aumento de la proporción de nucleolos vacuolados, de la misma magnitud que la disminución de nucleolos inactivos, manteniéndose en similares valores la proporción de nucleolos compactos (Figura 75). En menor medida que la inactivación producida por la microgravedad, estos datos muestran un aumento de actividad nucleolar como consecuencia de la hipergravedad, en consonancia con el aumento de tamaño nucleolar descrito anteriormente.

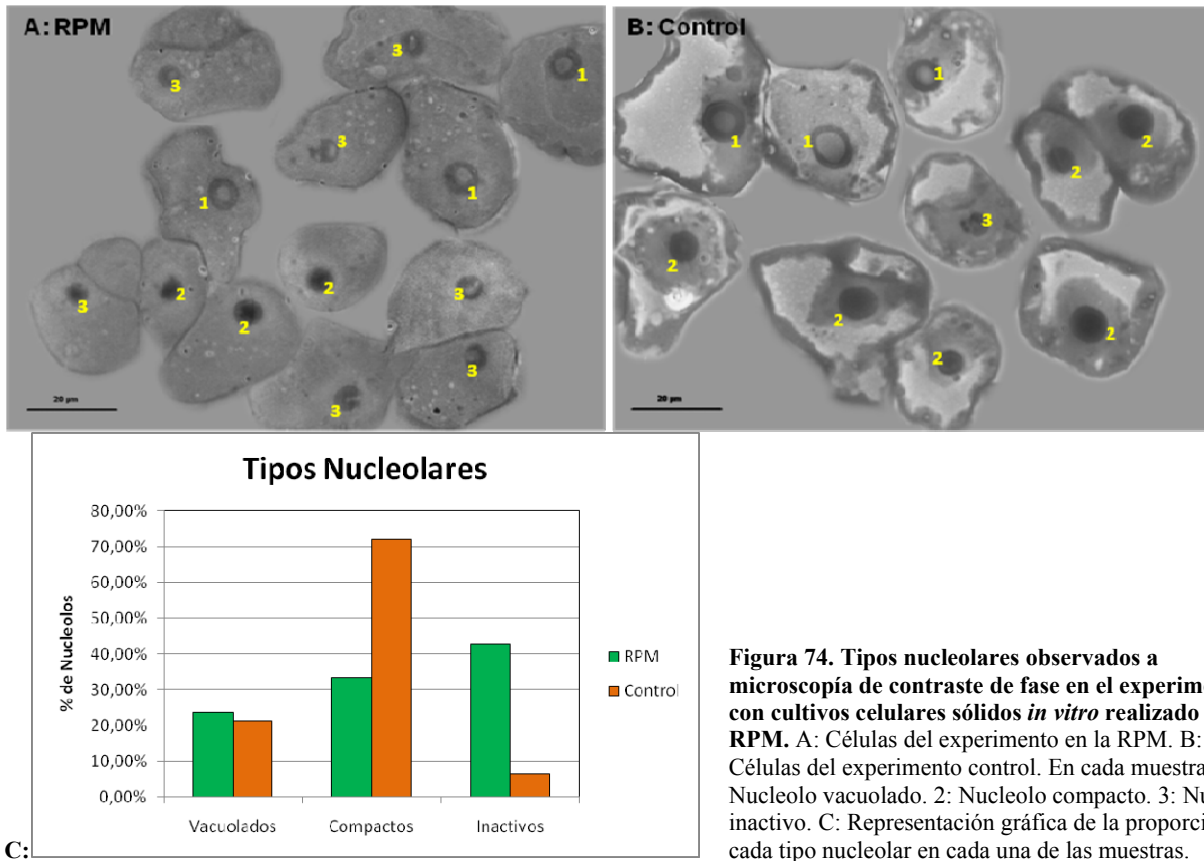


Figura 74. Tipos nucleolares observados a microscopía de contraste de fase en el experimento con cultivos celulares sólidos *in vitro* realizado en la RPM. A: Células del experimento en la RPM. B: Células del experimento control. En cada muestra: 1: Nucleolo vacuolado. 2: Nucleolo compacto. 3: Nucleolo inactivo. C: Representación gráfica de la proporción de cada tipo nucleolar en cada una de las muestras.

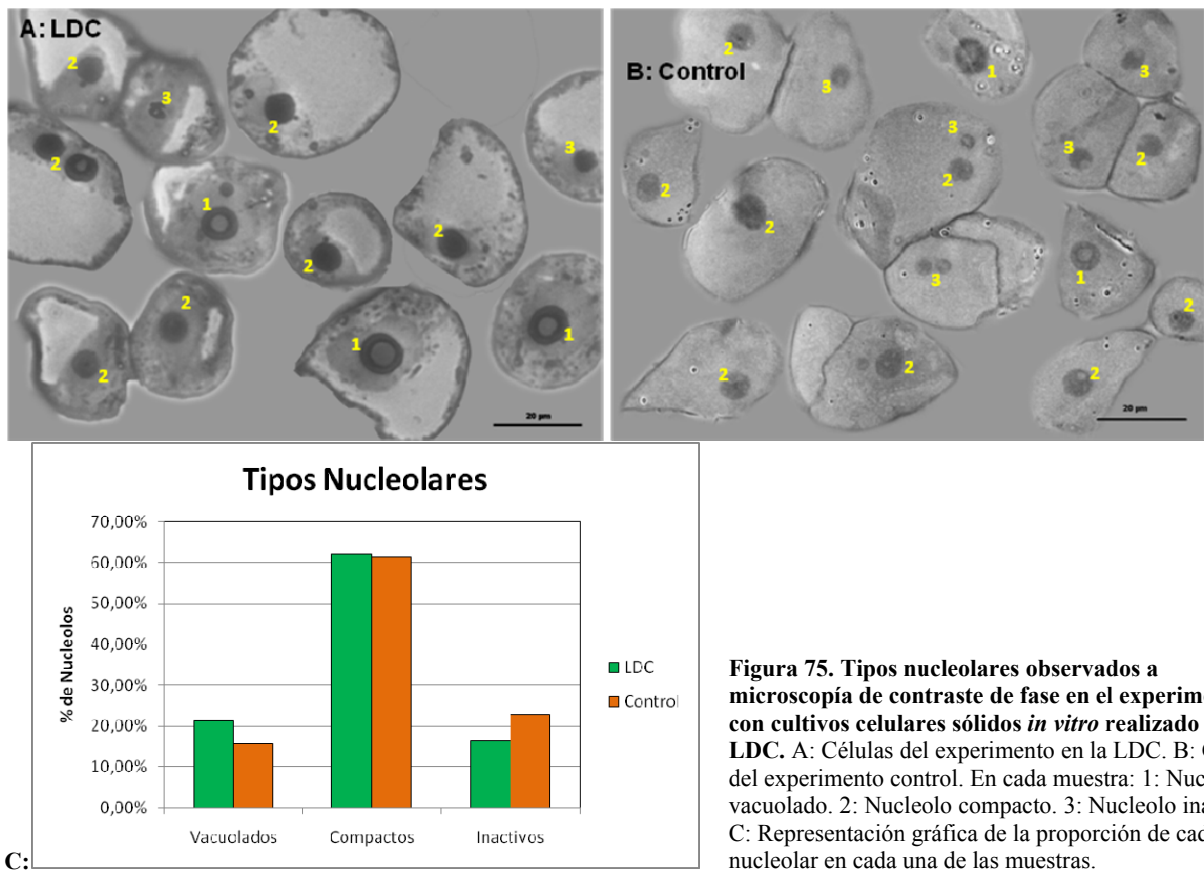


Figura 75. Tipos nucleolares observados a microscopía de contraste de fase en el experimento con cultivos celulares sólidos *in vitro* realizado en la LDC. A: Células del experimento en la LDC. B: Células del experimento control. En cada muestra: 1: Nucleolo vacuolado. 2: Nucleolo compacto. 3: Nucleolo inactivo. C: Representación gráfica de la proporción de cada tipo nucleolar en cada una de las muestras.

7.2. Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

Se determinó el estado del ciclo celular de las células del cultivo *in vitro* por citometría de flujo, mediante el marcado cuantitativo del DNA con DAPI, utilizando un extracto nuclear obtenido en cada tratamiento por triplicado y se calculó la media del porcentaje de células en las diferentes etapas del ciclo. En todos los dispositivos y en todas las condiciones de gravedad alterada, se observó un aumento del porcentaje de células en fase S y una disminución de las que están en fase G1 (Figuras 76 y 77). Esta alteración es especialmente significativa en las muestras sometidas a microgravedad simulada, tanto en la RPM como en el Levitador magnético (Figuras 76 y 77). La hipergravedad parece afectar en menor grado a la distribución de las fases del ciclo, hasta el punto de que la diferencia entre el control y el experimento en las muestras sometidas a la Centrífuga no resulta ser significativa (Figura 76). Sin embargo, el efecto de aumento en el porcentaje celular en fase S y la disminución en la fase G1 respecto del control externo, apareció también en la posición $1g^*$ del Levitador, con una magnitud similar, encontrándose diferencias significativas (Figura 77). Los resultados obtenidos en la posición $2g^*$ del mismo dispositivo son más parecidos a los de la posición $1g^*$ que a los obtenidos en la Centrífuga con el mismo valor de hipergravedad, por lo que es razonable pensar que las diferencias encontradas en la posición $2g^*$ del Levitador se deban principalmente al efecto del campo magnético.

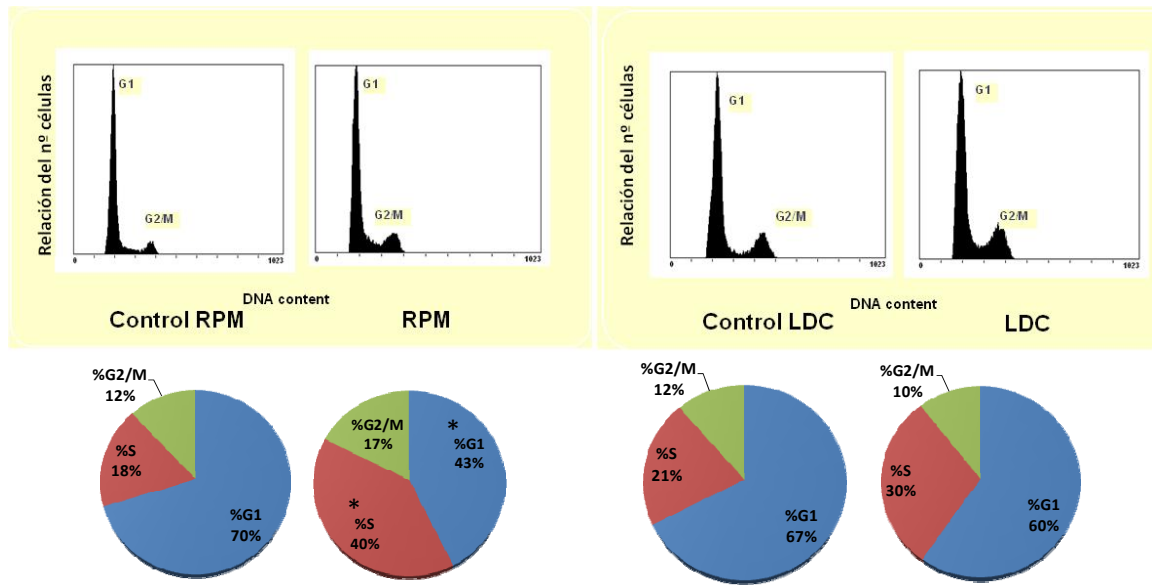


Figura 76. Representación gráfica del ciclo celular y distribución media de las poblaciones celulares en las diferentes etapas del ciclo celular sometidos a simuladores mecánicos (RPM y LDC). Se observan diferencias significativas en las muestras sometidas a microgravedad simulada en la RPM, un aumento de fase S y disminución de fase G1. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

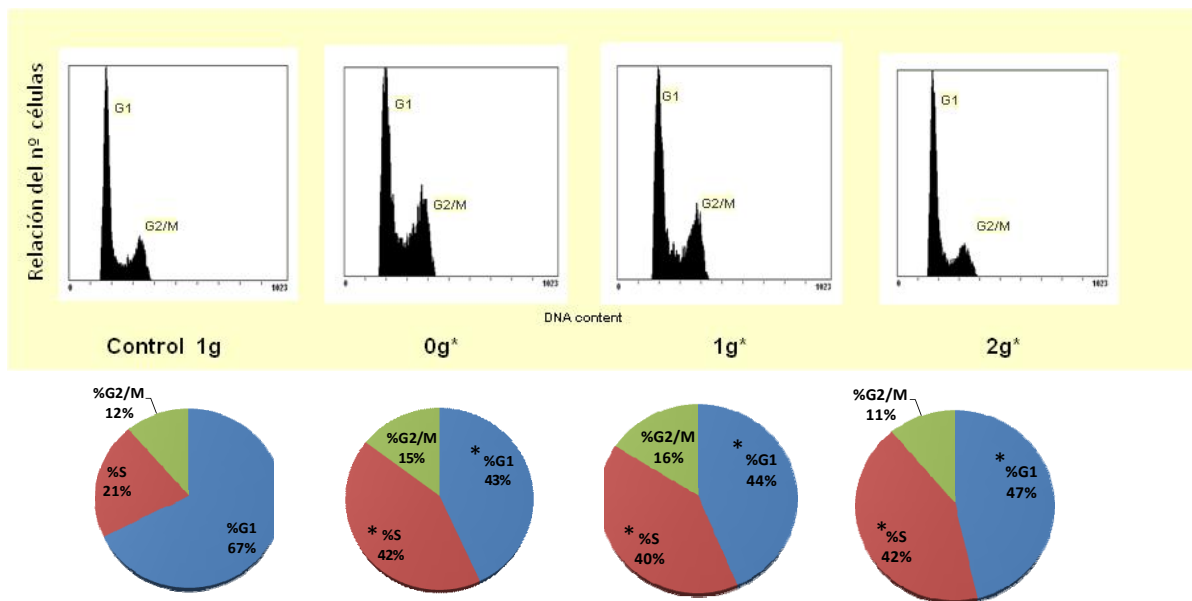


Figura 77. Representación gráfica del ciclo celular y distribución media de las poblaciones celulares en las diferentes etapas del ciclo celular en callos sometidos a Levitación magnética. En todas las muestras sometidas al campo magnético en las diferentes posiciones del Levitador, se produce un aumento de fase S y una disminución de fase G1. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

8. Estudios genómicos con cultivos celulares sólidos *in vitro* (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada

8.1. Estudios de expresión génica utilizando *microarrays* de transcriptoma completo

Como primera aproximación al estudio genómico de las alteraciones inducidas por los cambios gravitatorios en las células proliferantes de los cultivos sólidos *in vitro*, se realizó un estudio global a nivel de genoma completo. Los cambios de expresión génica en muestras sometidas a los diferentes simuladores de gravedad alterada se detectaron por hibridación de RNA total con *microarrays* de transcriptoma completo (Agilent 2 colores), usando dos análisis estadísticos diferentes: uno más permisivo, pvalue Limma sin corregir, y otro corregido para limitar la aparición de falsos positivos, pvalue Rank Prod-FDR. Los genes desregulados se agruparon según la denominada *gene ontology* (GO) para identificar si algún proceso biológico estaba sobrerrepresentado, con p-value <0,05. Los grupos GO se basan en tres parámetros principales de clasificación, que son: funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos, los cuales se dividen, a su vez, en subgrupos más específicos hasta llegar a grupos que comprenden procesos, funciones u orgánulos concretos. Por último se estudió y se comparó el perfil transcriptómico global entre las diferentes condiciones de gravedad alterada mediante el programa GEDI.

8.1.1. Estudios de cambios de expresión génica y análisis ontológicos en genes desregulados en gravedad alterada

a) Alteraciones génicas utilizando el análisis estadístico pval-Limma

El número de alteraciones génicas encontradas en los *microarrays* realizados sobre muestras sometidas a los diferentes tratamientos y su control 1g, obtenidas al considerar como criterio estadístico un valor de pval-Limma<0,01, se describe en la Tabla 5 (una tabla con el listado completo de las sondas génicas afectadas y su valor de expresión se encuentra en el material suplementario en formato electrónico (CD, Tabla 1)).

TABLA 5. Número de alteraciones génicas que se encuentran inducidas o reprimidas en diferentes tratamientos de gravedad alterada con p-valLimma < 0,01.							
Fuerza efectiva g* pval (LIMMA) < 0,01	0g*	0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	RPM	LDC
Intensidad del campo magnético (B)	10,1T	14.7T	16.5T	14.7T	10,1T	---	---
Fuerza mecánica	---	---	---	---	---	Sí	Sí
Nº Inducciones génicas	157	142	51	92	113	30	569
Nº Represiones génicas	132	187	54	161	145	86	687
TOTAL	289	329	105	253	258	116	1256

El campo magnético aplicado durante 3h 20 min causa, por sí solo (sin modificación de la gravedad), un total de 105 alteraciones a nivel de expresión génica. El número de sondas génicas alteradas en la posición 1g* es aproximadamente un tercio de las alteradas en el resto de posiciones del Levitador magnético. En estas posiciones, las correspondientes a la microgravedad simulada muestran más alteraciones génicas (0g* y 0,1g*, 289 y 329 respectivamente) que las de hipergravedad efectiva (1,9g* y 2g*, 253 y 258 respectivamente). Es interesante constatar que el número de genes reprimidos en las posiciones de hipergravedad y microgravedad simulada es mayor en el caso de los tratamientos intermedios 1,9g* y 0,1g*, donde el campo magnético es bastante más elevado, pareciéndose más al de la posición 1g*, mientras que en las posiciones 2g* ó 0g* hay una mayor inducción génica. Sin embargo los grupos ontológicos (GO) sobre-representados en los tratamientos 0g* y 2g* no son muchos, lo que indicaría que las alteraciones génicas afectan por igual a la mayoría de los grupos ontológicos preestablecidos. Al estudiar la ontología de los genes desregulados observamos un aumento de genes inducidos en los procesos biosintéticos, metabólicos primarios y secundarios y en los tilacoides. Para la condición 0g* se encuentran sobre-representados con un nivel de expresión inferior, los genes relacionados con la pared celular, citoesqueleto y con estructuras de encapsulación. En el tratamiento 2g* encontramos un aumento de expresión en los grupos relacionados con actividad catalítica y metabolismo secundario (Tabla 6).

Tabla 6 (PÁGINA SIGUIENTE). Estudio de enriquecimiento de genes desregulados en las diferentes condiciones de gravedad alterada (pval-Limma < 0,01 y p val-RankProd FDR < 0,05) por grupos ontológicos. Se muestran en la tabla sólo los grupos sobre-representados en alguna de las condiciones experimentales separados en los tres dominios ontológicos, usando el programa Bingo 2.3. Hemos utilizado +/- y/o ↑/↓ para indicar genes inducidos/reprimidos utilizando limma pvalue < 0,01 (destacado en gris claro, y la mayoría de los gris oscuro) y/o rankprod-FDR < 0,05 (destacado en gris oscuro) respectivamente. Un símbolo indica un p < 0,001 y dos símbolos p < 0,0005 para la significación del enriquecimiento usando el programa Bingo 2.3.

Tabla 6. Estudio de enriquecimiento de genes desregulados en las diferentes condiciones de gravedad alterada (pval-Limma < 0,01 y p val-RankProd FDR < 0,05) por grupos ontológicos.

A) Por componente celular	Fuerza efectiva (g*)	0g*	0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	2gLDC	0gRPM
	Campo Magnético (B)	14.7 T	10,1 T	16.5 T	14.7 T	10,1 T		
	Fuerzas mecánicas						SÍ	SÍ
cell			-/↓		-		-/++/↑	
cell wall		-/↑	↓		+/-		--/↓↓	
cytoplasm			--				++/↑	
cytoskeleton		-						
cytosol			--				++	
external encapsulating structure		-/↑	↓		+/-/↓		--/↓↓	
extracellular region						↓	+/-/↑/↓	
intracellular			--				++	
membrane			+		-		++/-/↑	
mitochondrion			-					
nucleolus			--				++	
nucleus			-				++	
peroxisome					+			
plasma membrane			+/-		+/-		-	
plastid			-		-		++/↑	
ribosome			--		-		++/↑	
thylakoid			+	+	-		++/↑	
vacuole			-				-	
B) Por proceso biológico	0g*	0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	2gLDC	0gRPM	
amino acid and derivative metabolic process		+	+					
biosynthetic process		-	+				++	
cell communication							--/↓	
cell cycle							+	
cell growth		↓			↓		+/-	
cellular component organization y biogenesis							+	
cellular process		-					++/-	
generation of precursor metabolites and energy		-			-		++/↑	
growth							++/-	
lipid metabolic process							-	
metabolic process		-					++/-	
photosynthesis		-			-		++/↑↑	
protein metabolic process							+/↓	
response to abiotic stimulus					+/-		+/-/↑	--
response to biotic stimulus		-			+		--/↓	
response to endogenous stimulus					-		--/↓	-
response to external stimulus					+/-		--/↓↓	-
response to extracellular stimulus						↓	--/↓↓	
response to stress					++		--/↓	--
secondary metabolic process	↑		+	+	+		-	
signal transduction							-	
translation		--					++	
transport							-	
C) Por función molecular	0g*	0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	2gLDC	0gRPM	
catalytic activity		+				+	-/↓	
DNA binding							-	
enzyme regulator activity					+			
hydrolase activity							--/↓	
molecular_function		-						
motor activity							+	
structural molecule activity		--			-		++	
transcription factor activity							--	
transcription regulator activity							--	
transferase activity							-	
transporter activity							-	

Usando la RPM como simulador mecánico de microgravedad obtuvimos 116 alteraciones génicas (menor cantidad de genes alterados que en el Levitador magnético). Solamente los grupos ontológicos de estrés están sobrerrepresentados (y reprimidos) en este grupo de genes. Los resultados obtenidos en el experimento llevado a cabo en la Centrífuga de gran diámetro, al doble de gravedad terrestre, fueron sorprendentes. Hemos encontrado 6 veces más alteraciones génicas en 2g LDC en comparación con la posición 2g* (en LDC, se alteran 1256 genes; Tablas 5 y 6). Muchos grupos ontológicos se encuentran sobrerrepresentados debido a la gran cantidad de alteraciones que se corresponden con un alto número de genes desregulados en este tratamiento. La mayoría de los grupos sobrerrepresentados en el resto de los tratamientos lo están también en este experimento de hipergravedad.

b) Análisis de alteraciones génicas utilizando el estadístico FDR (Rank Prod)

El número de alteraciones génicas que presentan cambios a nivel de expresión entre los diferentes tratamientos (con respecto control externo), considerando el análisis estadístico False Discovery Rate (FDR) Rank Prod $< 0,05$, es mucho menor que con el análisis anterior (Tabla 7; material suplementario en formato electrónico (CD, Tabla 1)), confirmando que es un análisis más riguroso a la hora de eliminar falsos positivos teniendo en cuenta diferentes parámetros estadísticos (Hong y Breitling, 2007).

En este análisis, tanto para microgravedad como para hipergravedad, se encontró una mayor cantidad de alteraciones génicas en las posiciones con menor influencia del campo magnético (0g* y 2g* frente a 0,1g* y 1,9g*, respectivamente). La tabla 6 refleja que ambos tests estadísticos detectan prácticamente los mismos grupos ontológicos enriquecidos aunque en algunos casos alcanzan la significación estadística tanto en la lista de genes inducidos como en la de reprimidos, reflejando un desajuste general de esos procesos. Usando FDR-rank prod en el caso del tratamiento 0g* detectamos afectada la pared celular, estructuras de encapsulación y aparece como nuevo grupo el metabolismo secundario. Sin embargo, en la condición 0,1g* cabe destacar que el análisis más estricto detecta un menor número de grupos que el estadístico anterior. En general, encontramos una mayor cantidad de expresiones

génicas reprimidas en las posiciones intermedias del Levitador; concretamente, en el caso del tratamiento 1,9g*, todas las alteraciones correspondieron a genes reprimidos (Tablas 6 y 7) solamente de dos grupos GO, crecimiento celular y estructura de encapsulación externa (Tabla 6). Este aumento de represión génica se apreció de la misma manera en los efectos causados por el campo magnético en exclusiva (1g*), donde no se encontró ningún grupo más representado que otro en el estudio GO. Esta observación es compatible con la aparición de una mayor represión génica en las posiciones de gravedad alterada con mayor campo magnético.

En la RPM no se encontraron muchas alteraciones en la expresión génica; la represión era mayor que la inducción génica, al contrario que lo observado en el tratamiento 0g* del Levitador (la misma respuesta que la registrada con el otro análisis estadístico). No encontramos grupos ontológicos sobrerrepresentados asociados con las alteraciones génicas en la RPM. Finalmente, en la Centrífuga encontramos una mayor cantidad de desregulaciones génicas, tanto reprimidas como inducidas, con la misma tendencia que la observada con el análisis anterior, también en este caso con un número considerable de grupos ontogénicos sobrerrepresentados (Tablas 6 y 7).

TABLA 7. Número de alteraciones génicas que se encuentran inducidas o reprimidas en diferentes tratamientos de gravedad alterada con un valor de FDR (Rank Prod) < 0,05 (FIESTA viewer v.1.0)							
Fuerza efectiva g* FDR (Rank Prod) <0,05	0g*	0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	RPM	LDC
Intensidad del campo magnético (B)	10,1T	14.7T	16.5T	14.7T	10,1T	---	---
Fuerza mecánica	---	---	---	---	---	Si	Si
Nº Inducciones génicas	54	15	2	0	28	5	102
Nº Represiones génicas	1	21	16	15	33	9	355
TOTAL	55	36	18	15	61	14	457

8.1.2. Comparación de genes desregulados entre las distintas condiciones de gravedad alterada.

Para comparar las diferencias de expresión entre los diferentes tratamientos utilizamos como herramienta los diagramas de Venn, mediante el procedimiento que puede encontrarse en la página web: <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>. Esta aplicación agrupa las alteraciones génicas registradas para cada gen y comparara el número de genes alterados que tienen o no en común diferentes tratamientos gravitatorios.

a) Análisis de genes desregulados utilizando el estadístico pval-Limma

Es muy revelador que al comparar los genes alterados comunes entre cualquiera de las posiciones del Levitador (Tabla 8), siempre se comportan de la misma manera en ambas posiciones, es decir, se inducen o se reprimen en ambas sin ningún caso contradictorio (un listado de genes con diferencias de expresión génica entre las diferentes condiciones experimentales se encuentra en el material suplementario en soporte electrónico (CD), Tabla 2). Este hecho sugiere que el efecto común entre las posiciones (presencia de un campo magnético intenso) es muy superior al efecto que discrimina las posiciones (atribuible a la alteración en la gravedad efectiva).

Cuando comparamos las muestras sometidas al campo magnético entre las posiciones de microgravedad simulada ($0g^*$ y $0,1g^*$) encontramos 41 genes en común (Tabla 8; material suplementario en formato electrónico (CD, Tabla 2)), un número mayor al de las posiciones de hipergravedad simulada (10). Sin embargo el mayor número de genes comunes entre dos condiciones se produce entre $0g^*$ y $2g^*$, indicando que son las dos condiciones que poseen un mayor número de genes comportándose de manera similar, posiblemente debido a que están influenciados por un campo magnético de la misma magnitud (Tabla 8). Por el contrario cuando comparamos $0g^*$ con $1,9g^*$, obtenemos un número muy reducido de genes en común, pudiendo deberse al aumento del campo magnético al que está sometida la posición intermedia, no correspondiéndose con lo que sucede en el caso contrario, al comparar la posición $2g^*$ con $0,1g^*$. Lo más interesante era comparar la posición $1g^*$ con el resto de tratamientos de Levitación magnética y observar qué cantidad de genes eran comunes. En este caso la cantidad de

genes desregulados con un valor de significación concreto fue escasa frente al control interno (Tabla 8). Algunos de estos genes coincidían entre los diferentes tratamientos, sobre todo entre las posiciones de micro- e hiper- gravedad alterada respectivamente (material suplementario en soporte electrónico (CD, Tabla2)). Si hacemos estudios ontológicos con las muestras de Levitación magnética eliminando los genes comunes con el control interno, no se observan diferencias importantes entre los grupos sobrerrepresentados. Sólo se encontraron pequeñas modificaciones en estos grupos en los tratamientos intermedios entre la fuerza del campo magnético y la gravedad alterada, es decir, en las posiciones 0,1g* y 1,9g*.

Al comparar los distintos simuladores para las mismas condiciones de gravedad alterada encontramos pocas coincidencias en la condición de microgravedad simulada (3 genes). El mayor número de coincidencias se dio entre RPM y la posición intermedia del Levitador 1,9g*, aunque algunas de ellas eran contradictorias. Es muy importante considerar que el número de similitudes entre la RPM y el resto de condiciones era muy bajo. Sin embargo, en hipergravedad obtuvimos un mayor número de coincidencias (30 genes), aunque no las suficientes si consideramos que la cantidad genes desregulados en la Centrífuga es mucho mayor, y en este caso hay muchos casos de comportamiento contradictorio en los genes comunes, sugiriendo una mezcla de respuestas (campo magnético, fuerzas mecánicas y fuerza gravitatoria efectiva). En muestras sometidas al doble de gravedad en la LDC, con las posiciones con las que más similitudes se observaron fueron con las posiciones de hipergravedad simulada del Levitador magnético (como era de esperar), siendo mayores con la posición intermedia 1,9g. (Tabla 8; material suplementario en soporte electrónico (CD), Tabla 2). Se obtiene un total de 29 coincidencias génicas al comparar ambos simuladores de fuerza mecánica. Posiblemente parte de estas similitudes se deban al efecto causado por la fuerza mecánica ejercida sobre las muestras en ambos aparatos; no obstante cabe destacar que muchos de estos genes comunes se comportan de diferente forma en los diferentes aparatos.

Tabla 8. Genes en común entre los distintos tratamientos (pval-Limma <0,01). Utilizando la aplicación de diagramas de Venn se pudo comparar los genes comunes alterados entre las diferentes condiciones de gravedad alterada. Se representan las comparaciones dos a dos, indicando el número total de genes alterados en cada condición (columna de la derecha) y el número de genes comunes en cada celda. Se incluye entre paréntesis el n° de ellos que están inducidos o reprimidos en cada situación (n° genes inducidos que coinciden en ambas condiciones / n° genes inducidos en la 1ª condición y reprimidos en la 2ª condición/ n° genes reprimidos en la 1ª condición e inducidos en la 2ª condición/ n° genes reprimidos en ambas condiciones).

Simuladores mecánicos				Simuladores de fuerza mecánica			
0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	RPM	LDC	1ª Condición	
						2ª Condición	n° genes alterados
41 (27/0/0/14)	9 (7/0/0/2)	4 (1/0/0/3)	72 (37/0/0/35)	3 (1/2/0/0)	26 (8/0/10/8)	0g*	283
	16 (7/0/0/9)	7 (3/0/0/4)	30 (17/0/0/13)	1 (0/1/0/0)	33 (5/13/7/8)	0,1g*	318
		11 (5/0/0/6)	11 (3/0/0/8)	1 (1/0/0/0)	17 (3/5/0/9)	1g*	96
			10 (1/0/0/9)	8 (2/0/2/4)	46 (1/17/5/23)	1,9g*	236
				4 (1/2/1/0)	30 (7/6/5/12)	2g*	251
					29 (10/3/5/11)	RPM	106
						LDC	1108

b) Análisis de genes desregulados utilizando el estadístico FDR (Rank Prod)

Realizamos el mismo estudio, pero considerando los genes desregulados según el estadístico más riguroso, observándose resultados similares y la misma coherencia en los cambios de expresión en muestras dentro del campo magnético (Tabla 9). Obtuvimos un número considerable de genes comunes entre las condiciones 0g* y 2g*, precisamente las que mayor número de genes afectados muestran. Cuando comparamos los distintos tratamientos con el control interno del Levitador magnético encontramos algunas curiosidades. En primer lugar sólo 2 genes son comunes entre la condición de microgravedad 0g* y el control interno (material suplementario en soporte electrónico (CD, Tabla 2)). El efecto del campo magnético, más elevado en la posición intermedia 0,1g*, se detecta como un mayor número de genes en común entre 1g* y 0,1g*. Los genes que se ven afectados por el campo magnético (1g*), excepto uno, son comunes con

Tabla 9. Genes en común entre los distintos tratamientos (FDR (Rank Prod) < 0,05). Utilizando la aplicación de diagramas de Venn se pudo comparar los genes comunes entre diferentes condiciones de gravedad alterada. Se representan las comparaciones dos a dos, indicando el número total de genes alterados en cada condición (columna de la derecha) y el número de genes comunes en cada celda. Se incluye entre paréntesis el nº de ellos que están inducidos o reprimidos en cada situación (nº genes inducidos que coinciden en ambas condiciones / nº genes inducidos en la 1ª condición y reprimidos en la 2ª condición/ nº genes reprimidos en la 1ª condición e inducidos en la 2ª condición/ nº genes reprimidos en ambas condiciones).

Simuladores mecánicos				Simuladores de fuerza mecánica			
0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	RPM	LDC	1ª Condición	
						2ª Condición	nº genes alterados
12 (11/0/0/1)	2 (2/0/0/0)	0 (0/0/0/0)	20 (20/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	7 (6/0/1/0)	0g*	40
	9 (2/0/0/7)	7 (3/0/0/4)	19 (10/0/0/19)	3 (3/0/0/0)	8 (2/1/2/3)	0,1g*	33
		5 (0/0/0/5)	13 (2/0/0/11)	1 (0/0/0/1)	5 (0/2/0/3)	1g*	14
			6 (0/0/0/6)	1 (0/0/0/1)	3 (0/3/0/0)	1,9g*	12
				4 (3/0/0/1)	17 (8/2/1/6)	2g*	55
					4 (2/0/2/0)	RPM	12
						LDC	376

la posición de hipergravedad 2g*. Sin embargo, el número de genes detectados con este método más riguroso es demasiado bajo para dar mucho valor a las comparaciones dos a dos, pero en algunos casos hay coincidencias en más de dos posiciones (Tabla 9). Por ejemplo en el tratamiento 1,9g* los genes comunes con el control interno también lo son con la condición 2g* y algunos de ellos también fueron comunes con el tratamiento 0,1g*, sugiriendo que esos genes son clave en la respuesta a fuertes campos magnéticos. (material suplementario en soporte electrónico (CD, Tabla 2)).

Cuando comparamos las alteraciones génicas en microgravedad alterada en la RPM con las distintas posiciones del Levitador, obtenemos una baja proporción de genes en común, no coincidiendo las alteraciones encontradas entre ambos tratamientos, excepto para el caso 1,9g* (la alteración génica encontrada también se muestra en el análisis anterior). En hipergravedad encontramos un mayor número de genes en común con las posiciones de hipergravedad simulada del Levitador. Se obtiene un total de 17 genes comunes entre ambos simuladores en condición 2g, con un concordante

porcentaje en similitud génica entre ambas posiciones, al compararse con el análisis anterior (Tabla 9). El número de similitudes entre ambos simuladores es muy bajo, debido a la baja cantidad de genes significativos encontrados en la RPM, pero por el contrario es de la misma magnitud que el encontrado entre la RPM y las posiciones de micro- e hiper- gravedad simulada del Levitador.

8.2. Estado transcripcional global en condiciones de gravedad alterada

En los análisis anteriores hemos analizado las inducciones o represiones génicas en cada condición y las coincidencias entre ellas desde el punto de vista cuantitativo de cada gen individual. Otro punto de vista alternativo es visualizar el patrón transcriptómico a nivel global en cada una de las diferentes condiciones analizando conjuntamente grupos de genes (*clusters*) que se comportan de la misma forma en nuestras condiciones experimentales. Para ello utilizamos el programa “GEDI”, del inglés *Global Expression Dynamic Inspector*, que nos permite la visualización de la expresión génica de todo el transcriptoma generando una imagen en mosaico, o matriz de puntos, formada por 20×16 píxeles. Cada punto de la matriz, representado por un píxel, corresponde a un grupo o *cluster* de genes que se comportan de manera similar en todas las condiciones experimentales. Cada píxel tendrá un color diferente que refleja la expresión media de los genes incluidos en este *cluster* en cada condición experimental comparada con el control 1g. El programa GEDI primero decide qué genes deben ir en cada *cluster* y después coloca *clusters* similares en la misma zona del mosaico, creando una imagen del transcriptoma global y permitiendo su análisis como una entidad por visualización simple en las diferentes condiciones gravitacionales. Para este análisis se normalizaron los datos de expresión como se indica en el apartado de material y métodos (ver apartado 7.4 de este capítulo de la Memoria) y de 44562 sondas incluidas en los arrays sólo se usaron 17419 para el análisis GEDI (las que mostraron un cambio significativo de expresión en al menos una condición). El programa organizó los resultados en mosaicos de 20×16 con un promedio de 54 genes por *cluster* (Figura 78).

Cuando comparamos entre sí los perfiles transcripcionales globales de las diferentes posiciones del campo magnético, no se observaron grandes diferencias entre

ellos, lo que sugiere un efecto del campo magnético muy importante (a nivel global, aunque si observamos la escala de la figura, el cambio es cuantitativo sólo en los vértices del panel donde se agrupan la mayoría de los genes que aparecían en los análisis previos). En la segunda fila de la Figura 78 hemos restado el efecto de la posición $1g^*$ al resto de las posiciones del Levitador para eliminar la influencia del campo magnético y tratar de desenmascarar el efecto gravitacional subyacente. El resultado que obtuvimos fue cuantitativamente muy suave (aparecen muy pocos *clusters* en rojo o azul oscuro en estos paneles) pero también muy similar a nivel transcripcional entre las dos posiciones de microgravedad ($0g$ y $0,1g$) y las dos de hipergravedad simulada ($1,9g$ y $2g$). Más aún, el efecto encontrado en microgravedad simulada era curiosamente contrario al efecto de hipergravedad simulada. Los *clusters* de genes reprimidos (azul) parecen inducirse (rojo) al invertir el sentido de gravedad alterada.

También estudiamos el patrón de expresión en los resultados de gravedad alterada en los simuladores de fuerza mecánica (Figura 78, tercera fila). Al comparar los perfiles entre la RPM y LDC encontramos perfiles diferentes de expresión, encontrándose algunas zonas similares (diagonal roja, por ejemplo) que podrían corresponderse con los efectos secundarios de las fuerzas inerciales generadas durante la simulación. A pesar de que a primera vista no aparecieron similitudes entre las posiciones $0g^*$ (Levitador) y $0g$ -RPM y las $2g^*$ (Levitador) y $2g$ -LDC, hemos localizado en la parte inferior izquierda del panel RPM un grupo de genes reprimidos (círculos azules) que se correspondieron con los genes inducidos (círculos rojos) en los paneles del Levitador $1,9g^*$, y más discretamente en $2g^*$. Una vez localizadas estas áreas se confirmó que en el resto del panel existía una tendencia general de expresión invertida. La correlación entre el perfil que muestra la posición $2g^*$ y la LDC tampoco es clara, pudiendo deberse a la gran cantidad de cambios encontrados en la LDC comparado con el tratamiento $2g^*$ (o con cualquier otra condición, Figura 78).

Por último cabe destacar que tanto en la versión con efecto magnético (*) como en la que hemos sustraído la posición $1g^*$, se observaron variaciones cuantitativamente más importantes, pero en las mismas zonas, en las posiciones con mayor intensidad de campo magnético ($0,1g^*$ y $1,9g^*$) confirmando los hallazgos equivalentes observados en los enriquecimientos de grupos ontológicos.

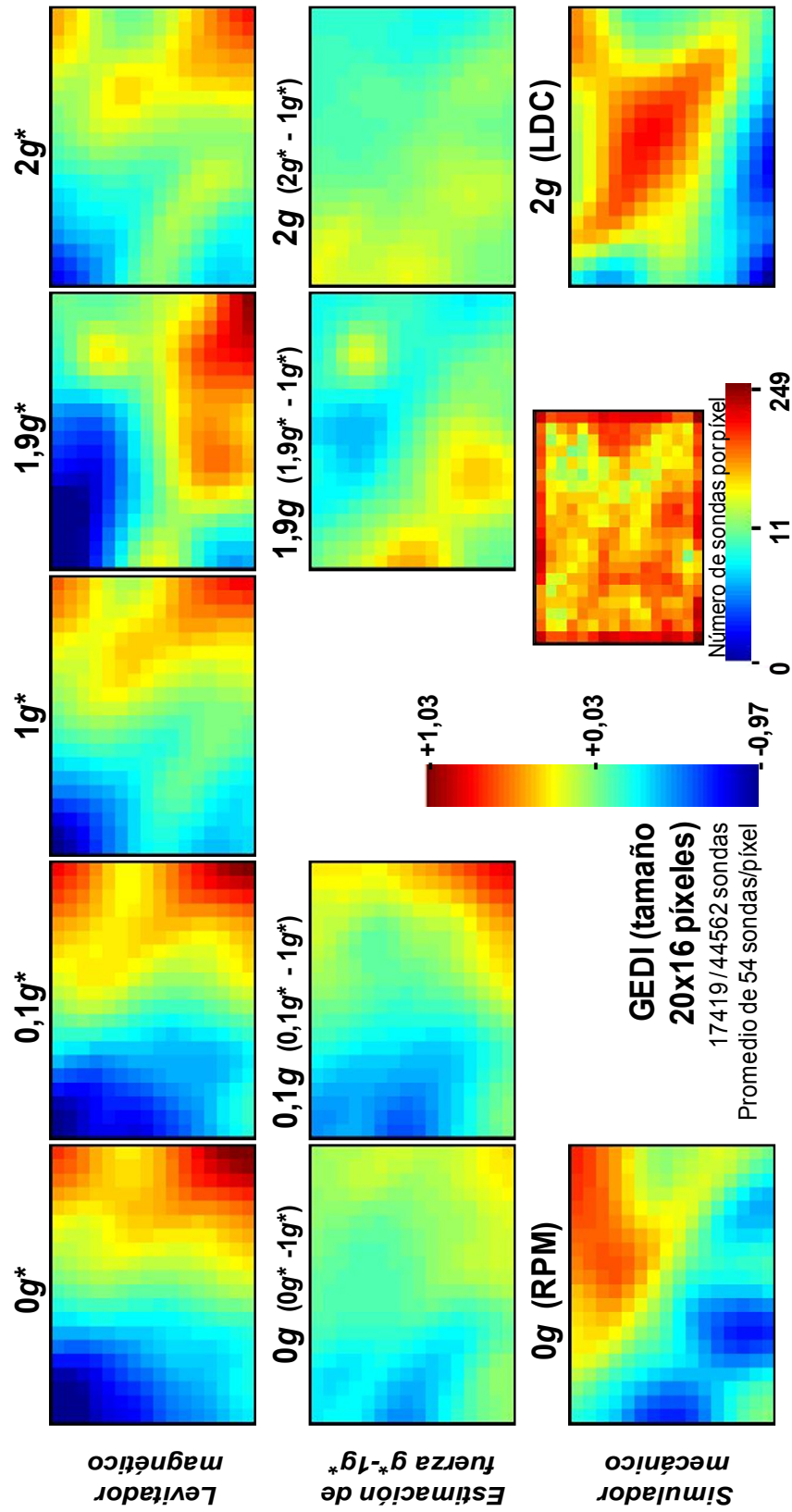


Figura 78. GEDI 20 x16. Estudio de cluster de genes en los diferentes simuladores de gravedad alterada. Representación gráfica del transcriptoma en las diferentes condiciones de gravedad alterada. Se muestra gráficamente el perfil de cada condición experimental comparada con su control. También se muestra en la segunda fila el perfil obtenido al restarle el efecto del campo magnético 1g* de la primera fila. En el centro en vertical se muestra el nivel del log2 ratio de cada cluster (cada recuadro) comparado con su control externo. En rojo se indica la inducción y en azul la represión. El cuadro central colocado en la parte de abajo de la imagen, muestra el número de cluster que se tienen en cuenta en cada recuadro (número medio de sondas por cluster es = 54).

8.3. Validación de la expresión de genes de crecimiento/proliferación celular mediante la técnica de PCRq

8.3.1. Análisis de la expresión de genes alterados en los *microarrays*

Recapitulando los datos obtenidos en el estudio con *microarrays*, de un total de 44562 sondas estudiadas encontramos un total de 2470 alteraciones génicas al combinar ambos análisis de estudio estadístico (pval-Limma <0,01 o FDR Rank Prod < 0,05), e incluso teniendo en cuenta ambos análisis con un nivel de significación para pval-Limma < 0,05 y de FDR (Rank Prod) < 0,05 (Tabla con el listado completo de las sondas génicas afectadas y su valor de expresión se encuentran en el material suplementario en formato electrónico (CD), Tabla 1). De entre todas estas alteraciones encontradas a nivel transcriptómico, si nos concentramos en los procesos biológicos que constituyen nuestro principal tema de estudio, la proliferación y el crecimiento celular, podemos destacar en el estudio ontológico las siguientes alteraciones:

- Proteínas ribosómicas.
- Proteínas relacionadas con la síntesis y mantenimiento de hormonas de crecimiento y desarrollo, principalmente con auxinas.
- Proteínas de senescencia.
- Proteínas de estrés.
- Proteínas de ciclo celular.

a) Análisis de la expresión génica en los genes relacionados con la proliferación y el ciclo celular en arrays.

La alteración del ciclo celular detectada por citometría de flujo en los cultivos celulares en la mayoría de condiciones de gravedad alterada es un resultado muy interesante y coherente con los resultados en plántulas completas. Por ello decidimos estudiar más a fondo las alteraciones encontradas en los genes del ciclo celular o

relacionados con él (una tabla con el listado de genes del ciclo celular alterados en diferentes condiciones experimentales se presenta en material suplementario en soporte electrónico (CD, Tabla 3)). De los 333 genes relacionados con el ciclo celular que hemos localizado en el array, se encontraron muy pocas diferencias significativas en las posiciones de microgravedad simulada ($0g^*$ y $0,1g^*$) y en la posición de hipergravedad $2g^*$ ($p\text{-val-Limma} < 0,01$) del Levitador magnético. En la LDC obtuvimos una mayor cantidad de genes de ciclo desregulados, como era de esperar por la gran cantidad de alteraciones génicas encontradas en este tratamiento de gravedad alterada. Sin embargo, la RPM no presentaba ninguna alteración significativa en los genes relacionados con el ciclo celular.

Entre estos genes relacionados con el ciclo celular elegimos sólo los genes que actúan directamente sobre la regulación del ciclo y que se describen en la Tabla 10 para realizar un análisis más profundo (que incluye validación de los resultados del array por PCRq). En la posición $0g^*$ del Levitador encontramos tres genes reprimidos: las ciclinas B1;2 y B1;4 implicadas en la transición G2/M del ciclo y el gen *SIM* relacionado con la CDKB1;1 y la ciclina B2;4. En condiciones de hipergravedad no coinciden los genes desregulados en ambos simuladores. En el caso de la Centrífuga hay más genes y están todos inducidos al contrario que en el tratamiento $2g^*$. Los genes desregulados en la Centrífuga están implicados en la transición G2/M o fase G2 (ciclina B1;4, *CDK1*;1 y ciclina B1;3), en la fase de síntesis (ciclina A1;1) y en la regulación del ciclo como represores (*KRP3*) o factores que interaccionan con CDKs (*CKS2*). En la condición $2g^*$ están reprimidos 2 genes implicados en la fase de síntesis (ciclina A1; 2) y en factores de acoplamiento de CDKs (*CKS1*).

b) Análisis de la expresión génica en los genes relacionados con crecimiento celular en arrays.

Junto a los genes relacionados con proliferación y ciclo celular, prestamos también atención destacada al comportamiento de los genes relacionados con crecimiento celular y biogénesis de ribosomas identificables en el array. Entre éstos, hemos encontrado alteraciones en genes de proteínas que forman parte de los ribosomas

(material suplementario en formato electrónico (CD, Tabla 1)), en los que se observó un aumento en su transcripción en la LDC y disminución en algunos de ellos en las posiciones de microgravedad simulada en el Levitador ($0g^*$ y $0,1g^*$). Curiosamente se observó alterado el gen de una subunidad del complejo enzimático RNA polimerasa II, complejo responsable de la transcripción extranucleolar.

Por otra parte, es importante destacar que encontramos también alteraciones en los genes de algunas enzimas o factores de transcripción importantes en la síntesis o en el transporte de determinadas hormonas, como las auxinas y ABA, implicadas en los procesos de proliferación y crecimiento celular; entre estos genes están los de la enzima sintetasa GH3,3 (AT2G23170,1), el factor de transcripción AXR3 (AT1G04250,1), o la proteína serina/treonina sintetasa ABI2 (AT5G57050,1).

TABLA 10. Cambios relativos (fold change) en la expresión de genes relevantes en la regulación del ciclo celular en gravedad alterada. Los valores en negrita y de mayor tamaño indican diferencias significativas frente al control 1g (pval- Limma < 0,01. FIESTA v.1.0)							
Condiciones de gravedad alterada	0g*	0,1g*	1g*	1,9g*	2g*	LDC	RPM
Nombre genes	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change
CKL14	1,35	1,42	1,21	1,08	1,14	1,03	1,07
CDKB1;1	-1,12	-1,19	1,01	-1,21	1,05	1,86	-1,14
CKS1	-2,03	-1,89	-1,52	-1,74	-1,48	-1,07	-1,12
CKS2	-1,51	-1,37	-1,19	-1,01	-1,02	1,45	-1,13
CYCA1;1	-1,49	-1,21	-1,09	-1,66	1,21	1,64	-1,05
CYCA1;2	-1,56	-1,69	-1,48	-1,28	-1,49	-1,12	-1,08
CYCB1;2	-2,15	-2,2	-1,63	-1,7	-1,11	1,12	-1,22
CYCB1;3	-2,03	-2,07	-1,56	-1,73	-1,13	1,72	-1,12
CYCB1;4	-2,13	-2,06	-1,64	-1,92	-1,06	1,74	-1,21
CYCB1;5	-2,01	-1,92	-1,47	-1,62	-1,01	1,2	-1,3
KRP3	1,04	1,02	1,1	1,19	1,1	1,7	1,23
SIM	-1,85	-1,74	-1,78	1,01	-1,44	-1,27	-1,18

8.3.2. Validación de la expresión de genes de proliferación y crecimiento celular por PCRq

Los resultados obtenidos en los *microarrays* necesitan ser validados con otras técnicas de análisis de ácidos nucleicos que permitan una cuantificación relativa de la expresión génica, normalmente la PCRq o PCR cuantitativa a tiempo real. A la hora de elegir genes para la validación, escogimos aquellos de especial interés en nuestro modelo de estudio basado en la proliferación (genes relacionados con diferentes etapas del ciclo celular) y el crecimiento celular (concretamente, genes relacionados con la función del nucleolo en la biogénesis de ribosomas, como fibrilarina y nucleolina). Los genes para analizar por PCRq se describen en la Tabla 11. Como gen endógeno para normalizar y cuantificar la expresión relativa de nuestros genes de interés utilizamos uno de los genes de la actina (ACT-2). Es un gen típico descrito en la literatura (Thellin *et al.*, 1999) como *housekeeping*, y, de hecho, no mostró diferencias significativas para ninguno de los tratamientos en los *microarrays*. Además, se hicieron estudios cuantitativos de su expresión, mediante PCRq en los que se normalizó la cantidad de RNA en cada tratamiento (incluyendo los controles), dando como resultado que no existían diferencias de expresión en ninguna de las condiciones experimentales.

Los primeros genes elegidos para los estudios de PCR cuantitativa fueron dos genes de proteínas nucleolares (crecimiento celular), la nucleolina L1 (*AtNuc-L1*) y la fibrilarina (*FIB1*) y un gen de ciclo celular, la ciclina B1, específico de la transición G2/M. La elección de estos genes (Tabla 11) tenía interés adicional por la posibilidad de comparación con los estudios anteriores en plántulas de *Arabidopsis thaliana* incluidos o citados en secciones previas de esta memoria (Matía *et al.*, 2007; 2010) Utilizando los datos de los *microarrays* no hemos encontrado diferencias significativas para la expresión de estos genes en ninguno de los tratamientos (excepto en una de las sondas para fibrilarina con un $p\text{-val-Limma} < 0,01$). A pesar de los resultados de los *microarrays*, nos parecía necesario reevaluar la expresión de estos genes en los cultivos celulares con una técnica de cuantificación más rigurosa, dado que se habían detectado diferencias de expresión (técnica del gen reportero de la β -glucuronidasa - GUS) o a nivel de localización de las proteínas (inmunocitoquímica a microscopía electrónica) por otras técnicas en experimentos con plántulas.

Tabla 11. Expresión en arrays de genes seleccionados para validar por PCRq. Se representa el número de sondas utilizadas para cada gen en el *microarray*. Y se representa el dato de expresión más representativo para cada gen en cada tratamiento. Se destaca en negrita cuando se encuentran diferencias de expresión significativas (p -val-Limma < 0,01).

Código TAIR	Nombre gen	Resultados en los <i>microarrays</i>							Función relacionada con el proceso
		0g* Fold change	0,1g* Fold change	1g* Fold change	1,9g* Fold change	2g* Fold change	LDC Fold change	RPM Fold change	
AT1G48920	ATNUCL1 (3 sondas)	1,02	1,11	1,1	1,1	1,27	1,16	1,12	Crecimiento celular
AT5G52470	FIB1 (4 sondas)	-1,21	-1,71	-1,36	1,41	-1,09	1,09	-1,93	Crecimiento celular
AT4G37490	CYCB1;1 (1 sonda)	-1,53	-1,64	-1,25	-1,06	-1,15	1,12	-1,17	Regulación de ciclo celular

Azul represión génica Rojo inducción génica

a) Análisis de la expresión de *AtNucL1* en cultivos celulares por PCRq

Observamos el aumento en la expresión de la nucleolina L1 en presencia del campo magnético (con diferencias significativas entre ambos controles, interno y externo al Levitador). También observamos un aumento leve de expresión en la posición intermedia 1,9g*, posiblemente asociada al fuerte campo magnético que también afecta a esta posición (Figura 79), aunque no ocurría lo mismo en la posición 0,1g* con la misma intensidad de campo magnético. En consecuencia, se produce una disminución de la expresión de nucleolina en todas las posiciones de micro- e hiper-gravedad simulada en el Levitador con respecto al control interno 1g*, sugiriendo que la alteración se da solo por encima de 14 Tesla de campo magnético o incluso que la gravedad alterada revierte el efecto del campo magnético.

En microgravedad simulada en la RPM se observa un aumento significativo de expresión con respecto al control del gen *AtNucL1*. En LDC (2g) no se observaron diferencias de expresión significativas para este gen (Figura 80).

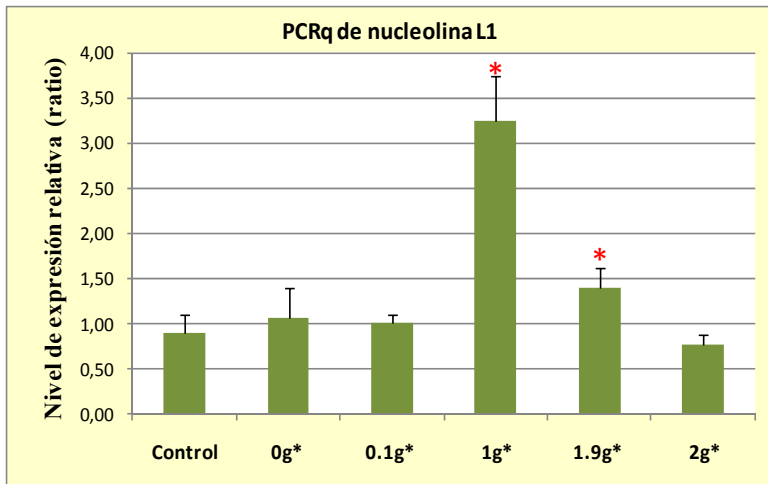


Figura 79. PCRq de nucleolina en las muestras del Levitador magnético. Existe un aumento de expresión entre control y 1,9g* y un mayor aumento al comparar 1g* y control externo. Existe una disminución de expresión en todas las posiciones de micro- e hiper-gravedad alterada al compararse con el control interno (representación del nivel de significación no se muestra en la figura).
Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

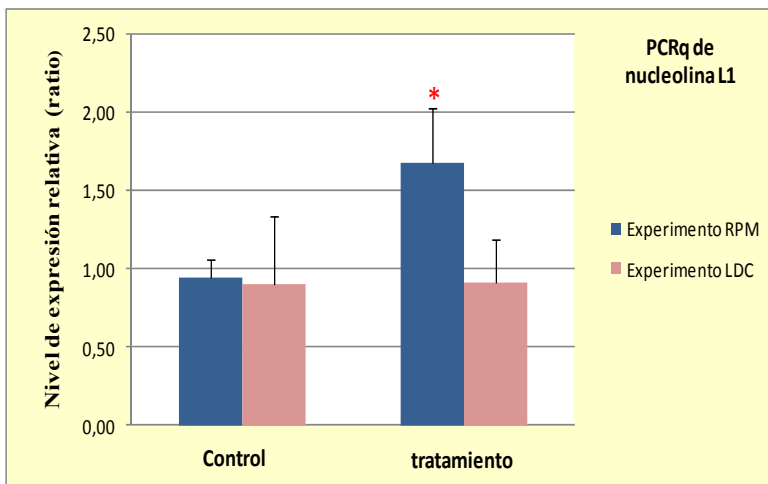


Figura 80. PCRq de nucleolina en la RPM y en la LDC. Existe un aumento en la expresión de esta proteína en microgravedad simulada. No se encontraron diferencias en hipergravedad.
Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

b) Análisis de la expresión del gen Fibrilarina 1 en cultivos celulares por PCRq

Las muestras sometidas al Levitador magnético mostraron pequeñas diferencias de expresión que no fueron significativas para ninguna de las posiciones al compararse con el control externo o cuando comparamos las condiciones de micro- e hiper-gravedad simulada con respecto al control interno sometido al campo magnético (Figura 81).

Sin embargo, la expresión del gen de la fibrilarina se observó aumentada en los simuladores de fuerza mecánica, tanto para microgravedad simulada (RPM), como para hipergravedad (LDC). En cualquier caso esa diferencia significativa de expresión no fue cuantitativamente mayor de la que se observa en la posición 1,9g* del levitador magnético por ejemplo (Figura 82).

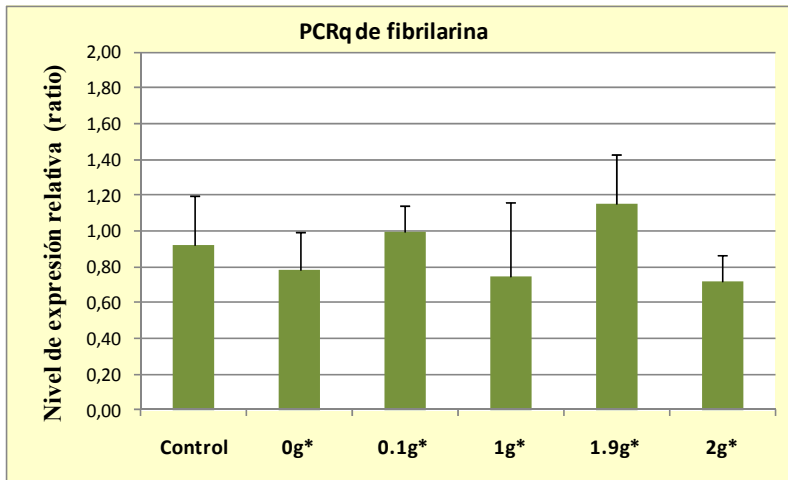


Figura 81. PCRq de fibrilarina1 en las muestras del Levitador magnético. Las diferencias no fueron significativas para ninguna de las posiciones

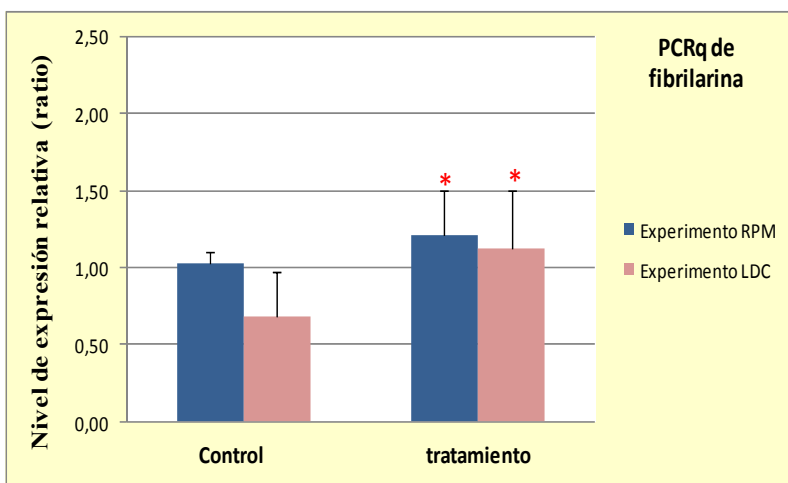


Figura 82. PCRq de fibrilarina 1 en las muestras en la RPM y en la LDC. Existe un aumento de expresión de fibrilarina en las posiciones de gravedad alterada simulada. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

c) Expresión del gen de la ciclina B1;1 en cultivos celulares por PCRq

La expresión de ciclina B1 disminuyó significativamente en hipergravedad simulada efectiva (2g*) al compararse con el control externo (Figura 83). Sin embargo al comparar el control interno con el resto de las posiciones del Levitador, encontramos un aumento significativo en el caso de la posición intermedia 1,9g* (Figura 83). Al estudiar la expresión del gen en simuladores mecánicos encontramos una disminución de expresión en microgravedad simulada en la RPM al contrario de lo que sucede en hipergravedad, donde se produce un aumento de expresión de ciclina B1 comparado con el control (Figura 84).

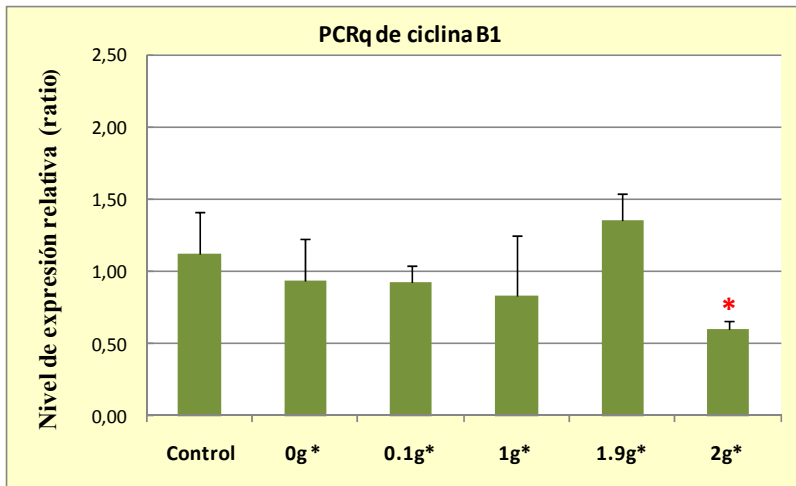


Figura 83. PCRq de ciclina B1;1 en las muestras del Levitador magnético. Se observa una disminución de expresión en la muestra 2g* comparada con el control externo. También existen diferencias significativas entre el 1g* y el 1,9g* (representación del nivel de significación no se muestra en la figura). Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

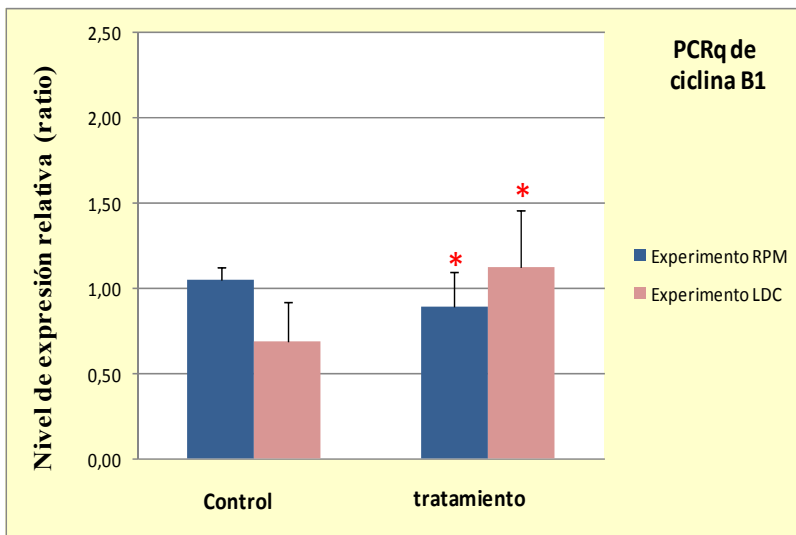


Figura 84. PCRq de ciclina B1;1 en la RPM y en la LDC. Existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos de gravedad alterada. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*)

8.3.3. Comparación de los resultados obtenidos por *microarrays* y PCRq

Los resultados obtenidos por PCRq no son exactamente iguales a los de los *microarrays*, pero sí siguen una tendencia de expresión similar para los genes estudiados (Figura 85). La alta sensibilidad de la PCRq permite que en algunos casos, pequeños cambios de la expresión alcancen la significación estadística, mientras que en el array las barras de error son considerablemente mayores y esos cambios de expresión no se consideran significativos. Para la fibrilarina, se da el caso opuesto. En el *microarray* se consigue alcanzar una diferencia significativa ($p\text{-val-Limma} < 0,01$) en la posición 0,1g*, aunque solo en una de las cuatro sondas disponibles para estudiar este gen. Este cambio en expresión (represión) fue pequeño y no se observó en la PCRq.

Por lo tanto, las diferencias de expresión localizadas son coherentes y validan los resultados de los arrays en general, con la única excepción del resultado anormalmente elevado en la PCRq de la AtNucL1 en las posición 1g* que no se detectó en el array (Figura 85).

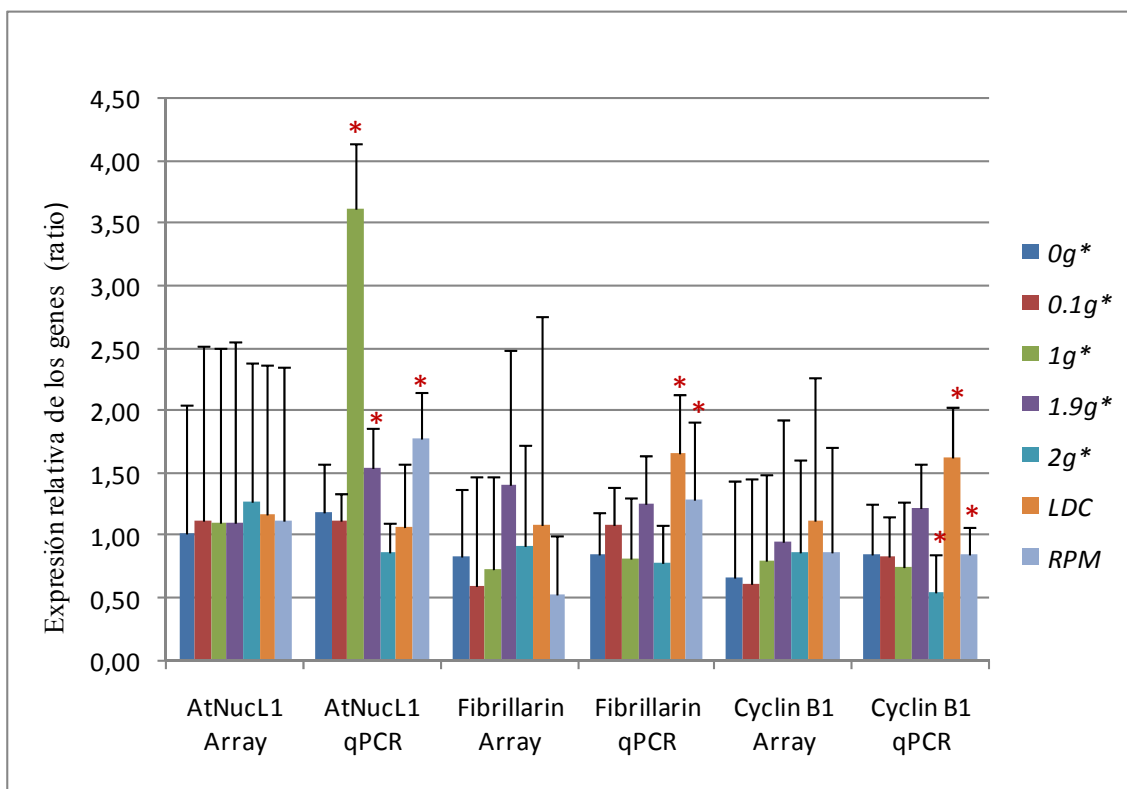


Figura 85. Expresión relativa de los genes analizados por ambas técnicas de estudio (microarrays y PCRq), con respecto al control externo 1g, en todos los simuladores utilizados. Los datos están normalizados con respecto al control externo, siendo la expresión de dicho control de 1. Se muestra el nivel de significación en las muestras analizadas por PCRq. Diferencias significativas $p < 0,05$ (*).

9. Estudios proteómicos con cultivos celulares sólidos *in vitro* (callos) en diferentes simuladores de gravedad alterada

A partir del extracto proteico extraído de callos vegetales en experimentos de gravedad alterada se hicieron geles bidimensionales diferenciales fluorescentes (por triplicado) y un SDS-PAGE bidimensional seguido de *Western-blot* contra la nucleolina para cada condición experimental. Las muestras intermedias del Levitador magnético (0,1g* y 1,9g*) sólo se utilizaron para el análisis anti-nucleolina.

Utilizamos la técnica de electroforesis bidimensional diferencial (DIGE “*difference gel electrophoresis*”) para estudiar y cuantificar el nivel de expresión de proteínas totales de una muestra con respecto a otra de forma equivalente a lo realizado a nivel genómico con los arrays. Esta técnica usa tres fluoróforos para marcar diferencialmente una muestra experimental, una control y una mezcla de todas las muestras del estudio, para normalizar las cantidades de proteína y correr un solo gel bidimensional. Esta mezcla sirve para normalizar la concentración de las muestras entre los diferentes geles y poder compararlos entre sí. Por otro lado, el *Western-blot* contra nucleolina nos ofrece una información funcional más concreta sobre una proteína de nuestro interés, particularmente sobre la cantidad, degradación y estados de desfosforilación/fosforilación de la proteína nucleolina L1.

9.1. Expresión diferencial de proteínas sometidas a diferente gravedad efectiva en geles bidimensionales (DIGE)

Estudiamos las diferencias en cantidad o en masa de las distintas proteínas (spots) entre los diferentes tratamientos de gravedad alterada usando 2 y 3 réplicas biológicas. Hicimos ambos análisis porque la tercera réplica en todos los tratamientos tenía un perfil global diferente debido a problemas técnicos, valorando incluso no considerarla en los resultados. Hemos aceptado una diferencia significativa en la cantidad de proteína entre dos muestras cuando el promedio del logaritmo de los ratio para cada spot es ≥ 1.2 o ≤ -1.2 y la t de student es $p < 0,05$.

Al comparar 2 ó 3 réplicas, en ambos casos fue identificado un efecto considerable del campo magnético en los niveles de proteínas, simplemente observando los geles cualitativamente (Tabla 12, Figuras 86, 87 y 90). Cuantitativamente, detectamos más proteínas que disminuyen en las muestras expuestas al campo magnético, efecto similar al observado en el análisis genómico donde el campo magnético favorecía la represión génica. La posición donde se encontraban más diferencias en masa entre las diferentes proteínas es en 2g*.

En simuladores de fuerza mecánica sólo encontramos proteínas de interés cuando comparamos 2 réplicas. Se observaron muy pocas diferencias en el volumen de spots en estos experimentos. Tan sólo una proteína de interés en la RPM y 3 en la LDC. Es sorprendente el resultado en la LDC, teniendo en cuenta los resultados de *microarrays* donde había una gran cantidad de alteraciones génicas.

En el caso de los tratamientos sometidos al campo magnético resultaba muy interesante comparar los *spots* detectados en distintas posiciones (micro- e hiper-gravedad) con el control interno 1g* en vez de con el control externo, para saber qué cambios a nivel de proteína se debían sólo a las diferencias de gravedad alterada (Tabla 13). Con este análisis encontramos un menor número de proteínas de interés como era de esperar, debido al fuerte efecto del campo magnético observado al comparar ambos controles.

TABLA 12. Spots significativamente alterados como resultado del DIGE en las diferentes condiciones de gravedad alterada. Se compara cada tratamiento con su control externo y existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$ (*).										
Muestras comparar	2 réplicas (nº proteínas)					3 réplicas (nº proteínas)				
	0g*	1g*	2g*	RPM	LDC	0g*	1g*	2g*	RPM	LDC
Intensidad campo magnético	10,1T	16.5T	10,1T	--	--	10,1T	16.5T	10,1T	--	--
Fuerza mecánica	---	---	---	SI	SI	---	---	---	SI	SI
Aumenta	22	4	56	1	1	13	15	34	0	0
Disminuye	38	14	61	0	2	17	20	55	0	0
TOTAL	60	18	117	1	3	30	35	89	0	0

Estos resultados parecen indicar que los efectos que provocan la microgravedad y la hipergravedad simulada a nivel de proteína son de intensidad inferior a los atribuibles al campo magnético, como también se observa en los simuladores de fuerza mecánica.

TABLA 13. Proteínas de interés como resultado del DIGE al comparar el efecto del campo magnético con el de la gravedad alterada. Se compara los tratamientos de micro- e hiper- gravedad y existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Muestras a comparar	2 réplicas (n° proteínas)			3 réplicas (n° proteínas)		
	Aumenta	Disminuye	TOTAL	Aumenta	Disminuye	TOTAL
0g*-1g*	2	4	6	2	7	9
2g*- 1g*	4	11	15	4	4	8

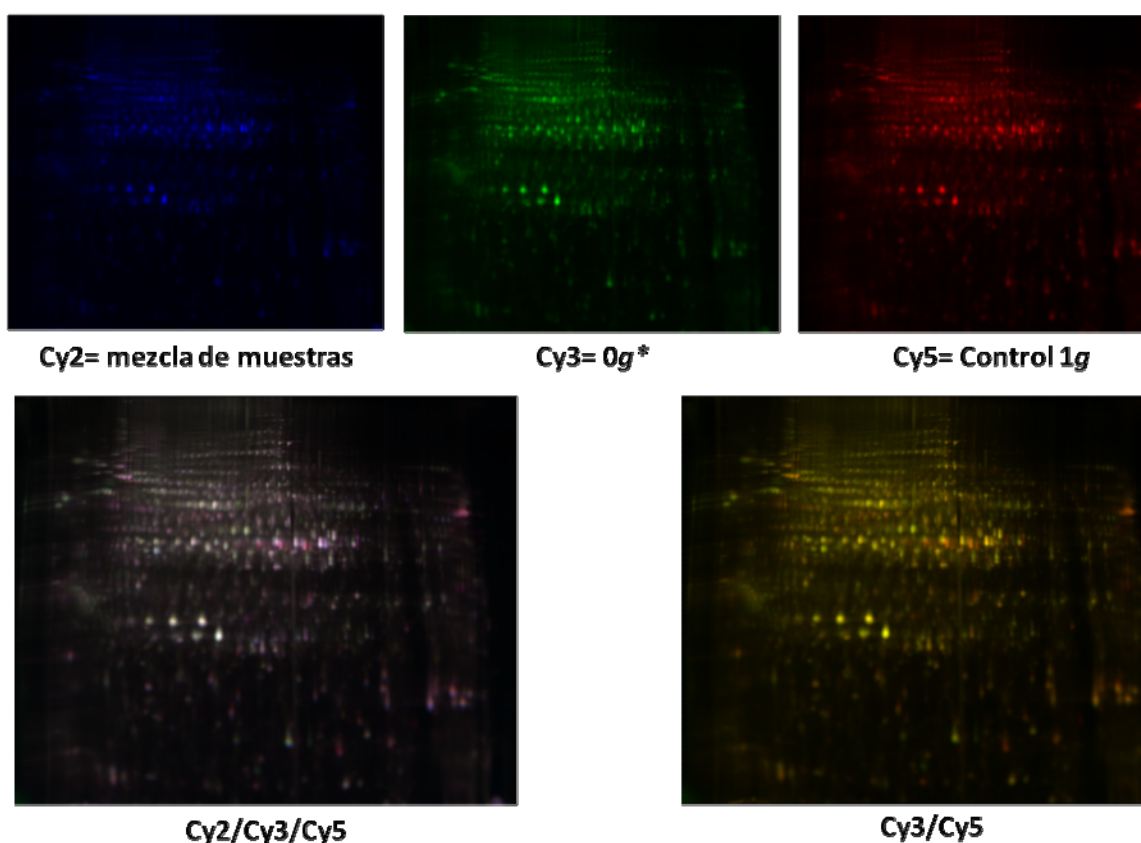


Figura 86. Representación del marcaje de las muestras para la realización del DIGE (0g* vs 1g). Se marcan con fluoróforos diferentes la muestra control, la muestra sometida a gravedad alterada y la mezcla de todas las muestras. Al superponer la imagen del control y la imagen del tratamiento, los spots colocalizan y aparecen con coloración amarilla cuando no hay cambios de expresión mientras que tienden al rojo o al verde si aumentan o disminuyen en expresión. La mezcla de todas las muestras del estudio es imprescindible como control de carga para poder comparar distintos geles cuantitativamente.

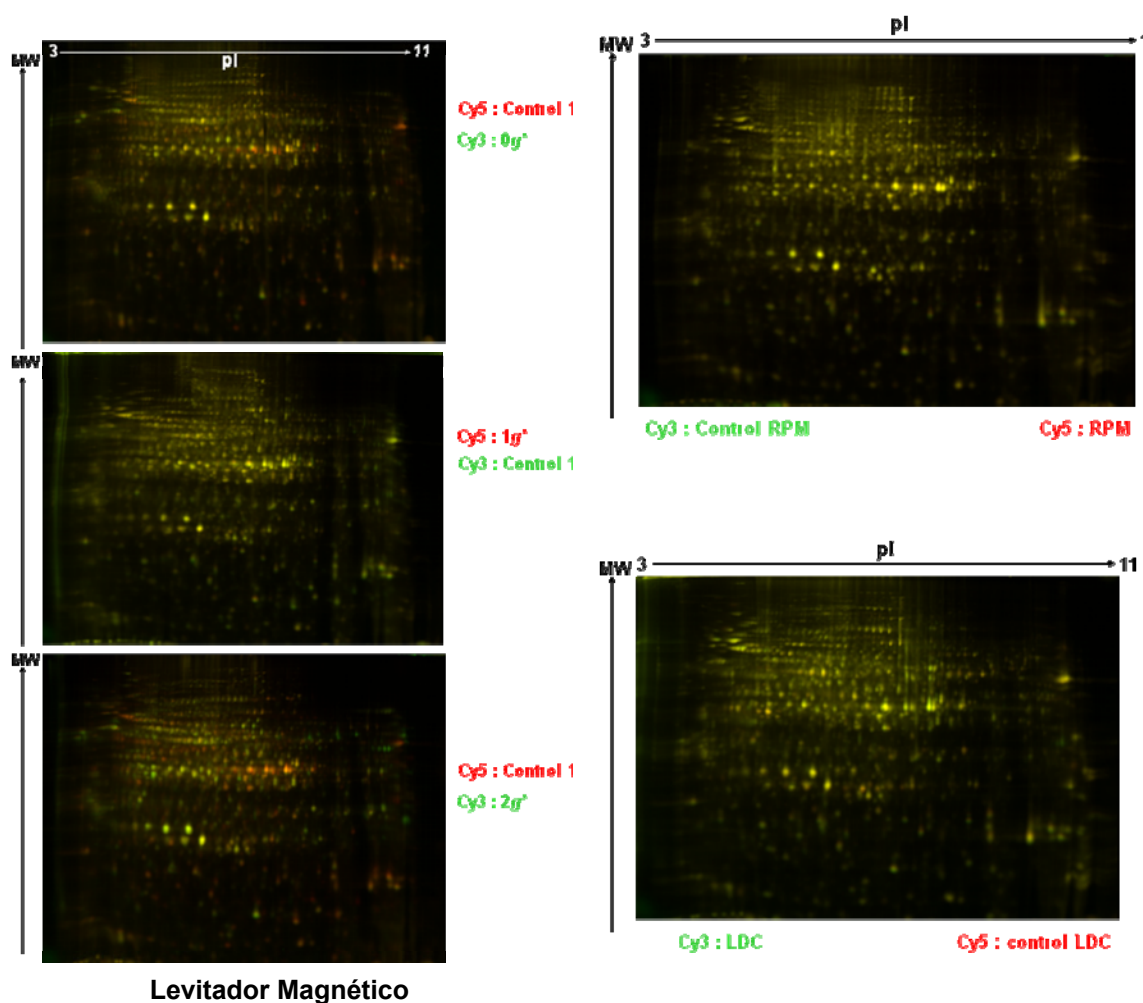


Figura 87. Resultados de la expresión diferencial de proteínas (DIGE) en diferentes condiciones de gravedad alterada, comparadas con los respectivos controles fuera del dispositivo. Se marcan con dos fluoróforos diferentes la muestra sometida a condiciones experimentales y el control (se indican en cada caso). En los spots coincidentes, colocan los fluoróforos y resulta coloración amarilla. Color rojo o verde supone diferencias de expresión.

9.1.1. Alteraciones comunes a nivel proteico en las muestras sometidas al campo magnético al compararse con ambos controles

En los análisis anteriores hemos obtenido el número de alteraciones de proteínas que se detectan al comparar las diferentes condiciones de gravedad alterada en el Levitador con ambos controles, interno y externo al aparato. Un paso adicional, que implicaba un análisis más concreto de los experimentos realizados en el Levitador magnético, consistió en comparar cada muestra sometida a gravedad alterada ($0g^*$ y

2g*) por separado con ambos controles, interno y externo (1g* y 1g, respectivamente), y procesar los datos obtenidos mediante la utilización de diagramas de Venn, herramienta de libre acceso en la red (<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>). Obtuvimos 2 proteínas en común en el caso de la microgravedad simulada y 7 proteínas en hipergravedad, como se muestra en la figura 88. Para este estudio utilizamos sólo los resultados de dos réplicas experimentales debido a que la tercera réplica y su cuantificación reducen la calidad del análisis, aunque sí hicimos un análisis general de los datos como se muestra en el apartado anterior.

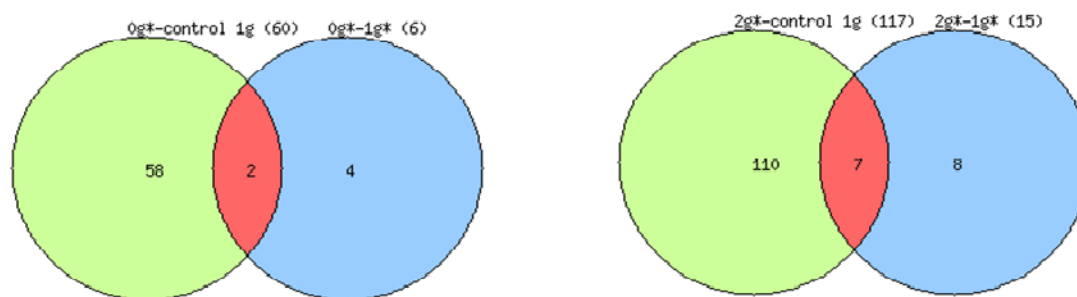


Figura 88. Diagramas de Venn resultantes de comparar las posiciones de gravedad alterada del Levitador magnético con el control externo e interno. Se representa en la parte central coincidente entre ambas circunferencias el número de proteínas coincidentes entre ambos análisis. Fuera de la intersección se representa el número de proteínas no coincidentes. Arriba se muestra el tipo de análisis y el número total de proteínas.

Xg* -control 1g: nº proteínas de interés al comparar cada tratamiento con el control externo 1g.

Xg* - 1g*: nº proteínas de interés al comparar cada tratamiento con el control interno 1g*.

Mediante diagramas de Venn también fueron comparadas todas las proteínas alteradas procedentes de las muestras del Levitador magnético, cuando se comparaban con respecto al control externo, para averiguar si alguna proteína de interés era común. Obtuvimos 2 proteínas en común entre el tratamiento 0g* y 2g* (Figura 89) y sorprendentemente no hubo coincidencias entre las muestras de gravedad alterada con la posición 1g*. Repetimos el análisis comparando la posición de micro- e hiper- gravedad alterada cuando se utilizó como control la posición de campo magnético 1g* (Figura 89), no encontrándose similitudes entre ambos grupos.

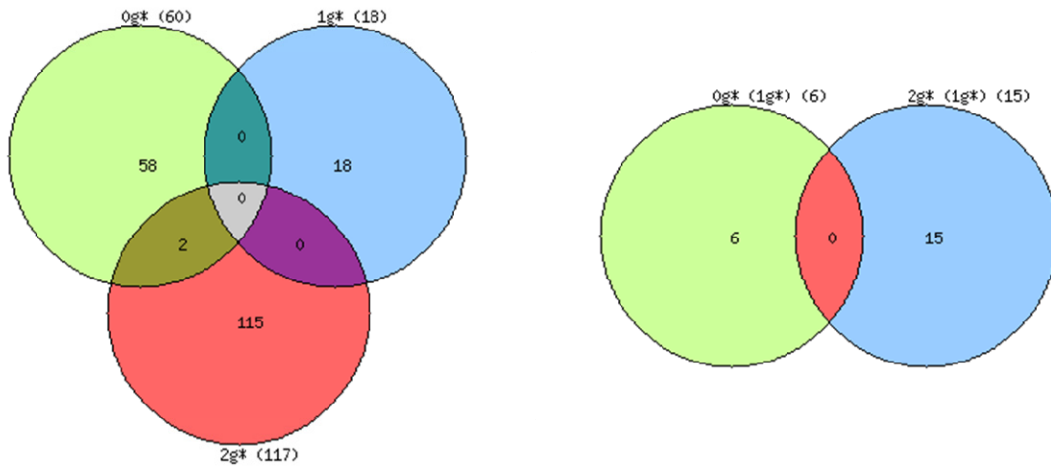


Figura 89. Diagramas de Venn entre los diferentes grupos del Levitador magnético. A la izquierda se muestran los grupos de proteínas de interés entre las diferentes posiciones del Levitador cuando se compara con el control externo. Vemos 2 proteínas coincidentes entre las posiciones 2g* y 0g*. A la derecha se muestran los grupos de proteínas de interés al comparar las muestras de gravedad alterada con el control interno 1g*. No se observa ninguna coincidencia entre estas proteínas.

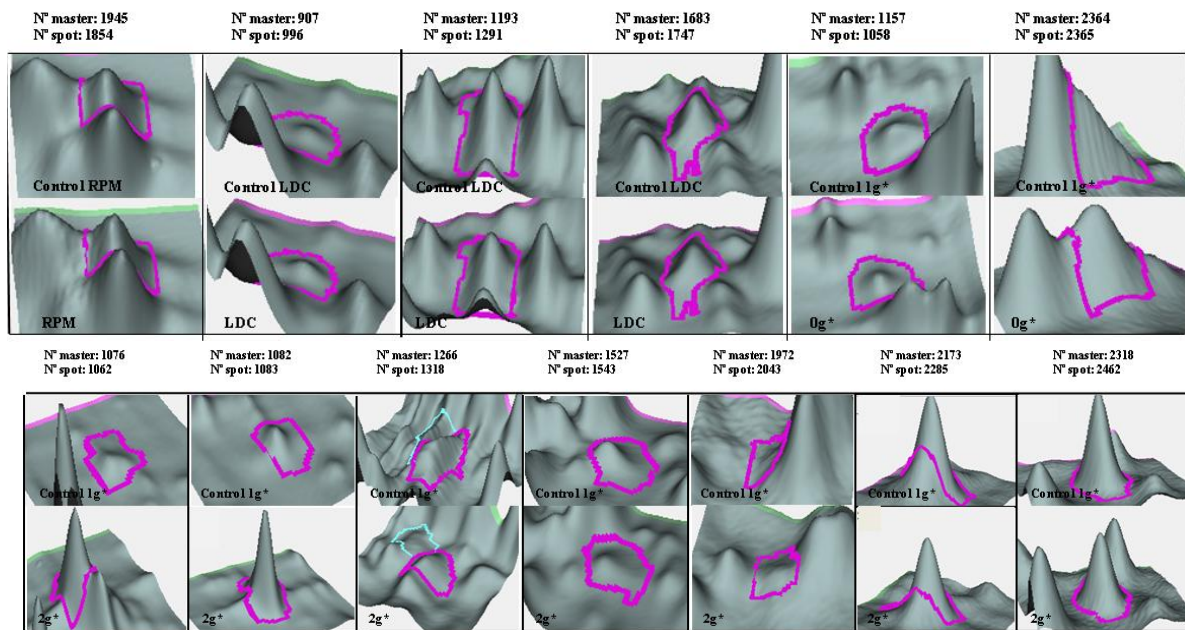


Figura 90. Representación gráfica de las diferencias de expresión (densitometría de geles 2D) entre el control y algunas muestras de gravedad alterada. Se presentan las muestras alteradas en la RPM y LDC. También se representan las muestras sometidas a 0g* y 2g* coincidentes al compararse con ambos controles (en la figura sólo se representa al compararse con el control 1g)

9.1.2. Selección de proteínas para su identificación por secuenciación

Una vez obtenido el resultado numérico de las alteraciones a nivel de proteoma consecuencia de los distintos tratamientos de alteración de la gravedad, el siguiente paso era identificar estas proteínas que aparecían alteradas e interpretar en lo posible su significado biológico. Como punto de partida en este análisis decidimos seleccionar todas las proteínas que mostraban alteraciones en los simuladores de fuerza mecánica (RPM y LDC) y, de los experimentos en el Levitador magnético, las coincidentes tras la comparación de las condiciones de gravedad alterada con ambos controles (1g/1g*). Por otra parte también nos pareció interesante, en el caso del Levitador, identificar las dos proteínas encontradas en común entre micro- e hiper- gravedad simulada con respecto al control 1g externo, al igual que un par de proteínas en el caso de microgravedad simulada (0g*) al ser comparadas con el control 1g, por su localización y su desregulación. Por último seleccionamos también para secuenciación dos proteínas que presentaban diferencias entre el control interno y el externo (1g/1g*), por presentar diferencias significativas considerables (Estas proteínas se describen en la siguiente Tabla 14 y en la Figura 90). Finalmente un total de 19 proteínas nos parecieron de gran interés en nuestro estudio sobre los efectos de la gravedad alterada. La mayoría de las proteínas elegidas están disminuidas con respecto a los controles. Sin embargo, la única proteína de la RPM se encontraba aumentando, aunque el cambio no era demasiado grande. En la posición 2g* del Levitador las dos proteínas que mayor cambio presentan en masa con respecto a cualquiera de los controles también aumentan.

Los spots seleccionados fueron digeridos y analizados por la espectrofotometría de masas MALDI-TOF/TOF. Para su identificación mediante el banco de datos público, se utilizó el buscador MASCOT, donde se comparan las masas peptídicas teóricas del banco de datos con las obtenidas en nuestros experimentos, obteniéndose una lista de posibles candidatos estadísticamente validados con una determinada puntuación (“score”) y un p-valor <0,05 (cuando la puntuación es mayor de 72). La puntuación se corresponde con la probabilidad de que una digestión de fragmentos proteicos al azar se corresponda con una determinada proteína; cuanto mayor es el grado de similitud, mayor puntuación se obtiene. Para algunos spots proteicos se han obtenido diferentes posibilidades de similitud, indicando una posible mezcla o contaminación por parte de

otras proteínas. Los resultados se describen en la Tabla 15 (los perfiles proteicos obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF se encuentran en el material suplementario en soporte electrónico (CD)).

Tabla 14. 19 proteínas de interés en los diferentes tratamientos de gravedad alterada. Se muestra en la tabla cada condición experimental comparada con respecto a que muestra control. Se representa el nº de máster y el nº de spot que se corresponde para identificarlo en los geles. El nivel de significación de la t-student y el promedio de los ratios entre las muestras.

Condición experimental	Muestra control	Nº Máster	Nº Spot	T-TEST (p<0,05)	Av Ratio (\geq ó \leq 1.2)
RPM	Control RPM	1945	1854	0,021	1,26
LDC	Control LDC	907	996	0,046	1,44
	Control LDC	1193	1291	0,034	-1,39
	Control LDC	1683	1747	0,031	-1,21
0g*	Control 1g	928	1058	0,0064	-1,28
	Control 1g*	1157		0,011	-1,36
	Control 1g	2180	2365	0,016	-2,24
	Control 1g*	2364		0,040	-1,54
	Control 1g	717	844	0,00043	-2,25
	Control 1g	846	975	0,039	2,07
2g*	Control 1g	939	1062	0,014	4,91
	Control 1g*	1076		0,035	4,86
	Control 1g	960	1083	0,0070	6,79
	Control 1g*	1082		0,0047	9,78
	Control 1g	1186	1318	0,022	-1,84
	Control 1g*	1266		0,021	-1,71
	Control 1g	1400	1543	0,0013	-1,87
	Control 1g*	1527		0,0046	-1,55
	Control 1g	1876	2043	0,0013	-1,49
	Control 1g*	1972		0,028	-1,42
	Control 1g	2100	2285	0,015	-1,90
	Control 1g*	2193		0,023	-1,71
	Control 1g	2256	2462	0,00081	-2,57
	Control 1g*	2318		0,024	-2,00
0g* y 2g*	Control 1g	663	788 (0g*)	0,020	-1,66
			664 (2g*)	0,015	-2,69
		749	877 (0g*)	0,0022	-2,08
			776 (2g*)	0,016	-1,46
1g*	Control 1g	1899	1859	0,046	-2,52
		2375	2316	0,0069	-2,55

En el experimento de microgravedad simulada en la RPM no se ha podido identificar la proteína que se encontraba aumentada por limitaciones técnicas. En el simulador de fuerza mecánica de hipergravedad se obtuvo un aumento en una proteína que presentaba varias posibilidades de similitud, todas ellas relacionadas con metabolismo y con la asimilación de iones (Tabla 15). Las otras dos proteínas alteradas en este tratamiento estaban relacionadas con pared celular (celulasa 3; AT1G71380) y con respuesta a iones y metabolismo de carbohidratos (ATGLX1; AT1G11840).

En Levitación magnética se secuenciaron dos proteínas desreguladas por el campo magnético; una de ellas no se pudo identificar y la otra se correspondía con una proteína de la cadena respiratoria mitocondrial (ATPHB6; AT2G20530). En microgravedad simulada ($0g^*$), no se pudieron identificar dos de las cuatro proteínas de interés. Las otras dos proteínas identificadas se correspondían con una proteína con actividad oxido-reductasa (sks5; AT1G76160) y otra proteína relacionada con calreticulinas (ATCRT1A; AT1G56340). Por su parte, en la posición $2g^*$, encontramos un mayor número de proteínas alteradas de interés, correspondiéndose con un aumento de proteínas relacionadas con el plegamiento o con el metabolismo de la pared celular (chaperoninas y BGU15; AT2G44450). Las proteínas disminuidas en estas condiciones se identificaron como un factor de iniciación de transducción (eIf-4A1), proteínas de metabolismo (GAPC1, APS1...), también encontradas en la LDC pero con un aumento en la cantidad de proteína, una proteína tumoral (TCTP) y un factor de despolimerización de actina (ADF3). También se encontró curiosamente desregulada una proteína hipotética descrita en otra subespecie (ARALYDRAFT, *Arabidopsis lyrata*). Los resultados de secuenciación de las proteínas coincidentes con cambios en masa entre las posiciones de micro- e hiper- gravedad simulada, revelaron que estas proteínas estaban relacionadas con la síntesis de ATP vacuolar (VHA-A) y con actividad oxido-reductasa (sks5; AT1G76160), enzima coincidente con una proteína secuenciada en posición $0g^*$.

Tabla 15. Identificación de proteínas en los spots de interés en los diferentes tratamientos de gravedad alteradas. El número de master que se corresponde con cada spot, aparece marcado en rojo, si está aumentado (<i>Average ratio</i>) y en azul si está disminuido.			
Condición experimental	Nº Máster	Score	Descripción proteína
RPM	1945		No identificada
LDC	907	519	fructosa-bifosfato aldolasa
		308	GAPC1 (gliceraldehído-3- fosfato- deshidrogenasa, subunidad C)
		227	cinnamil-alcohol deshidrogenasa, (CAD)
		226	GDH1 (glutamato deshidrogenasa I)
	1193	204	ATCEL3 (celulasa 3)
		128	T6D22.2 (<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>)
0g*	1683	622	ATGLX1 (glioxilasa I)
	928		No identificada
	2180		No identificada
	717	270	sks5 (similar a SKU5)
2g*	846	650	ATCRT1A (calreticulina)
	939	141	chaperonina
		117	BGLU15 (beta-glucosidasa 15)
	960	194	BGLU15 (beta- glucosidasa 15)
		1186	302
	254		MTO3 (metionina sobre-acumulador 3)
	123		Glutamina sintetasa citosólica (<i>Populus tremula x Populus alba</i>)
	1400	354	GAPC1 (gliceraldehído-3-fosfato- deshidrogenasa C, subunidad I)
		241	Proteína desconocida (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
		185	ASP1 (aspartato amino transferasa I)
		115	fructosa-bisfosfato aldolasa.
	1876	142	proteína hipotética ARALYDRAFT_910048 (<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>)
	2100	326	TCTP (proteína tumoral controlada traduccionalmente)
	2256	301	ADF3 (factor 3 de despolimerización de actina)
0g* y 2g*	663	687	proteína de choque térmico <i>hsp70</i>
		208	VHA-A (Vacuolar ATP sintetasa, subunidad A)
	749	620	sks5 (similar SKU5)
1g*	1899	250	ATPHB6 (prohibitina 6)
	2375	197	proteína desconocida (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

9.2. Análisis de cuantificación y estado de la proteína At-NucL1 mediante la técnica de *Western-blotting*

Los efectos de la gravedad alterada sobre modificaciones post-traduccionales de las proteínas se han estudiado sobre una proteína nucleolar que ya ha sido objeto de investigación en otros apartados de la presente memoria: se trata de la nucleolina, una proteína que desempeña un papel funcional clave en la biogénesis de los ribosomas, para lo cual sufre un proceso de fosforilación y desfosforilación, que es detectable por *Western-blot* a partir de geles bidimensionales. Para la realización de los *Western-blot*, utilizamos dos anticuerpos contra la nucleolina L1, específicos de dos regiones diferentes de dicha proteína, uno contra la región terminal GAR (AtNuc-L1(p)) y otro contra la región intermedia de reconocimiento de RNA denominada RRM (AtNuc-L1).

En los dos simuladores de fuerza mecánica obtuvimos resultados contrarios en uno y otro. En la RPM, se observó un menor rango de pI (punto isoeléctrico), indicio de una disminución en el número de variantes fosforiladas de la proteína y una menor cantidad en la proteólisis de la proteína, es decir, menor cantidad de proteína en las bandas de degradación (Figura 91). Según los estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, estas características corresponden a una menor actividad de la proteína (González-Camacho y Medina, 2005; 2006). Sin embargo, en la LDC, se observaron isoformas en un mayor rango de pI y mayor cantidad de proteína degradada, y por consiguiente, una mayor actividad proteica (Figura 92). Estos resultados son compatibles con una disminución de la actividad nucleolar en el caso de la microgravedad y un aumento asociado a las condiciones de hipergravedad.

El campo magnético por sí sólo también produce alteraciones a nivel de regulación postraduccionales de esta proteína. El resultado más evidente a primera vista es una fuerte disminución de la cantidad de proteína detectada (comparar control 1g y 1g* en la Figura 93), apareciendo también en el control interno del Levitador un acortamiento del rango de pI, correspondiente a la disminución de variantes fosforiladas, y una menor degradación proteolítica. En las posiciones de gravedad alterada, observamos, en primer lugar una disminución de la cantidad de proteína en la posición de hipergravedad simulada. En todo caso, la cantidad de proteína en las dos

condiciones de alteración de gravedad ($0g^*$ y $2g^*$) era menor que la que presentaba el control externo, con diferentes bandas de degradación, siguiendo un patrón muy similar entre ambas condiciones experimentales (Figuras 92 y 93); incluso, el *Western-blot* con el anticuerpo contra la región GAR, mostró que casi toda la proteína detectada se encontraba en formas proteolizadas en diferente grado; sin embargo, tanto en microgravedad simulada ($0g^*$), como en hipergravedad simulada ($2g^*$), la nucleolina se comportaba de la misma manera, distribuyéndose en un rango de pI muy similar al del control externo (el cual es mayor que el del campo magnético solo, $1g^*$), aunque

Experimento RPM

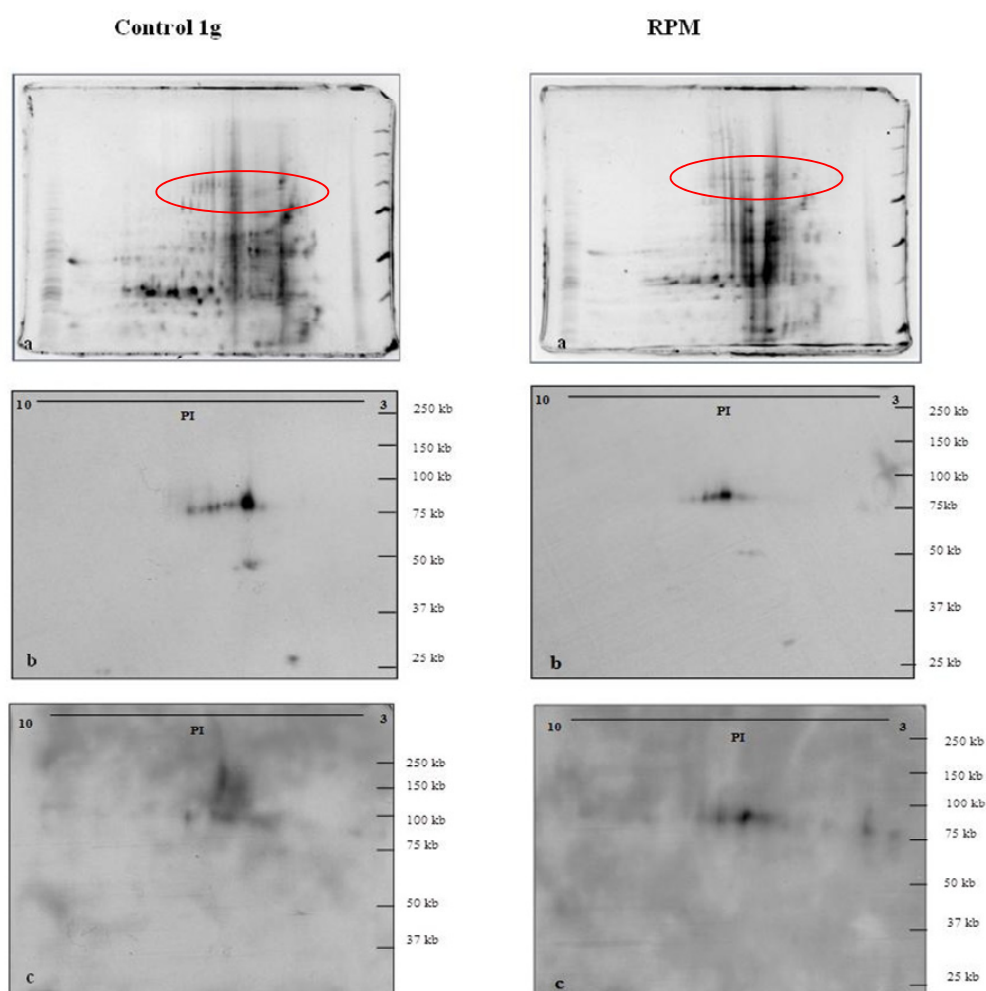


Figura 91. Geles bidimensionales y *Western-blot* (AtNuc-L1) en el experimento de microgravedad simulada en la RPM. a) Proteínas totales en geles bidimensionales. La proteína AtNuc-L1 se representa en los geles marcada con una circunferencia roja. b) *Western-blot* con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región GAR de la nucleolina (dilución 1:2000). c) *Western-blot* con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región RRM (dilución 1:1000).

aparecieron diferencias en los spots concretos revelados, que indicarían diferencias en las variantes fosforiladas. En ambas posiciones intermedias (0,1 g* y 1,9g*) se reveló el mayor efecto del elevado campo magnético, de modo que el rango de pI era similar al del control interno 1g*, correspondiente a una menor diversidad de variantes fosforiladas; en cambio, se obtuvo un alto grado de degradación de la proteína, que indicaría, por otra parte, una fuerte actividad (Figura 93).

Experimento LDC

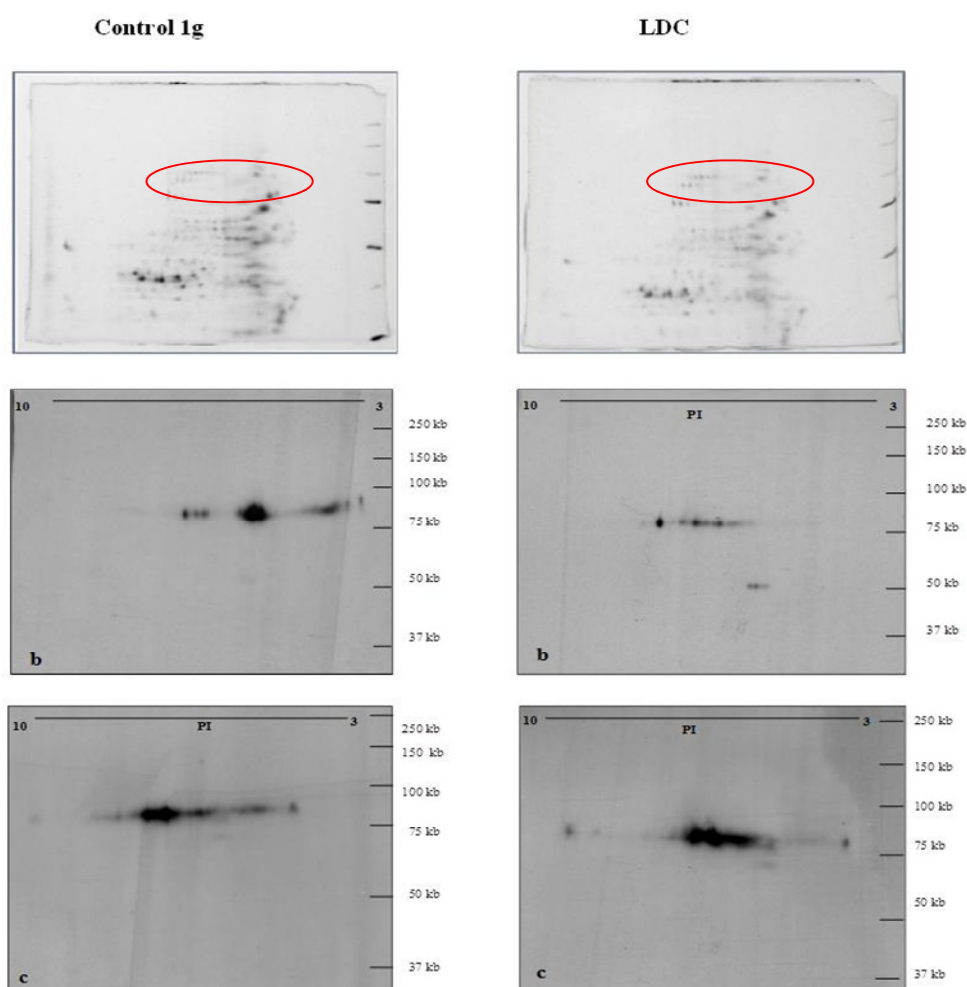


Figura 92. Geles bidimensionales y Western-blot (AtNuc-L1) en el experimento de hipergravedad en la LDC. a) Proteínas totales en geles bidimensionales. La proteína AtNuc-L1 se representa en los geles marcada con una circunferencia roja. b) Western-blot con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región GAR de la nucleolina (dilución 1:2000). c) Western-blot con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región RRM (dilución 1:1000).

Experimento Levitador (microgravedad)

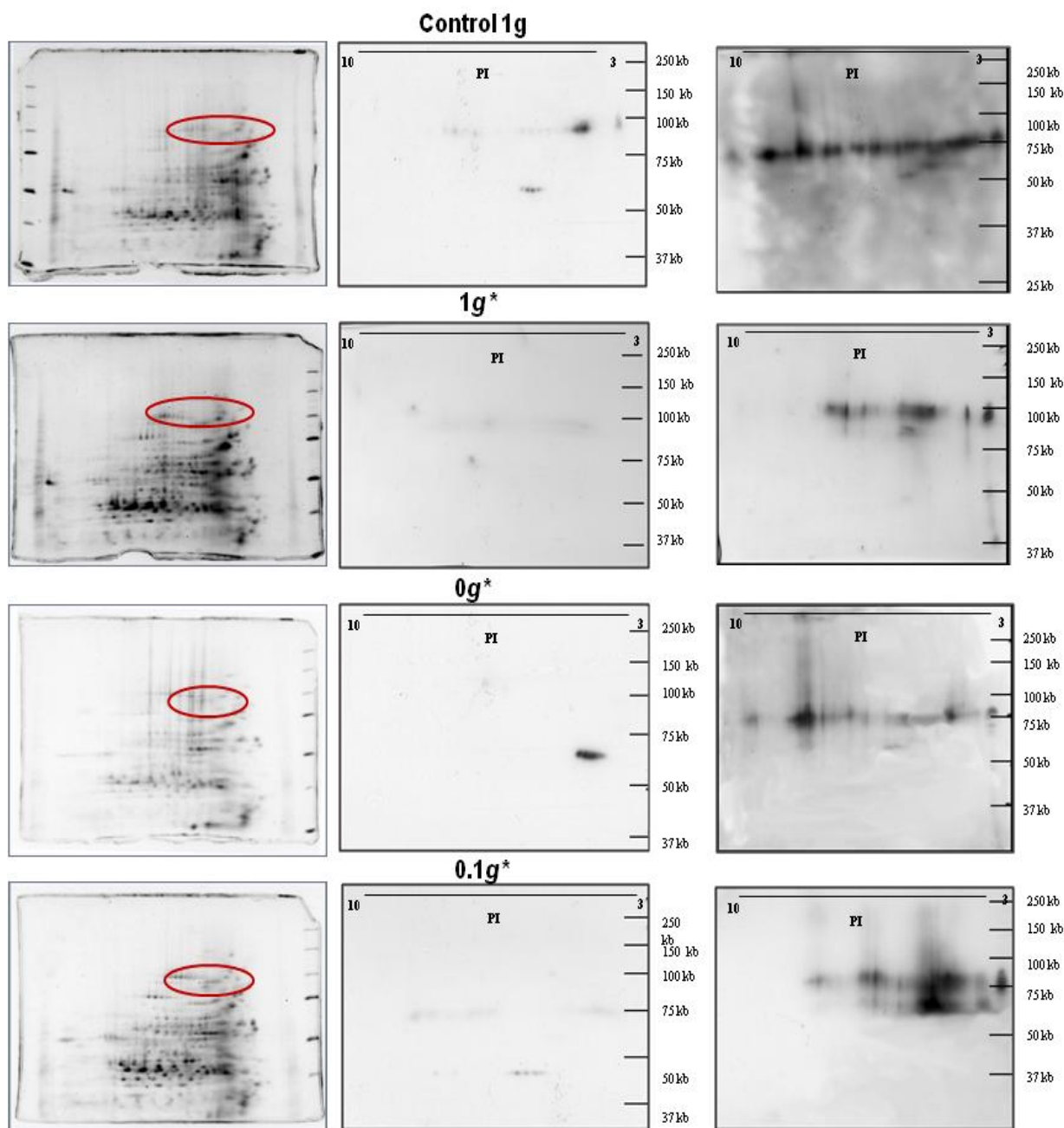


Figura 93a. Geles bidimensionales y Western-blot (AtNuc-L1) en Levitación magnética. Se representan los geles bidimensionales de proteínas totales en los controles de Levitación magnética ($1g/1g^*$) y las posiciones de microgravedad simulada ($0g^*/0,1g^*$; a) Proteínas totales en geles bidimensionales. La proteína AtNuc-L1 se representa en los geles marcada con una circunferencia roja. b) Western-blot con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región GAR de la nucleolina (dilución 1:2000). c) Western-blot con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región RRM (dilución 1:1000).

Experimento Levitador (hipergravedad)

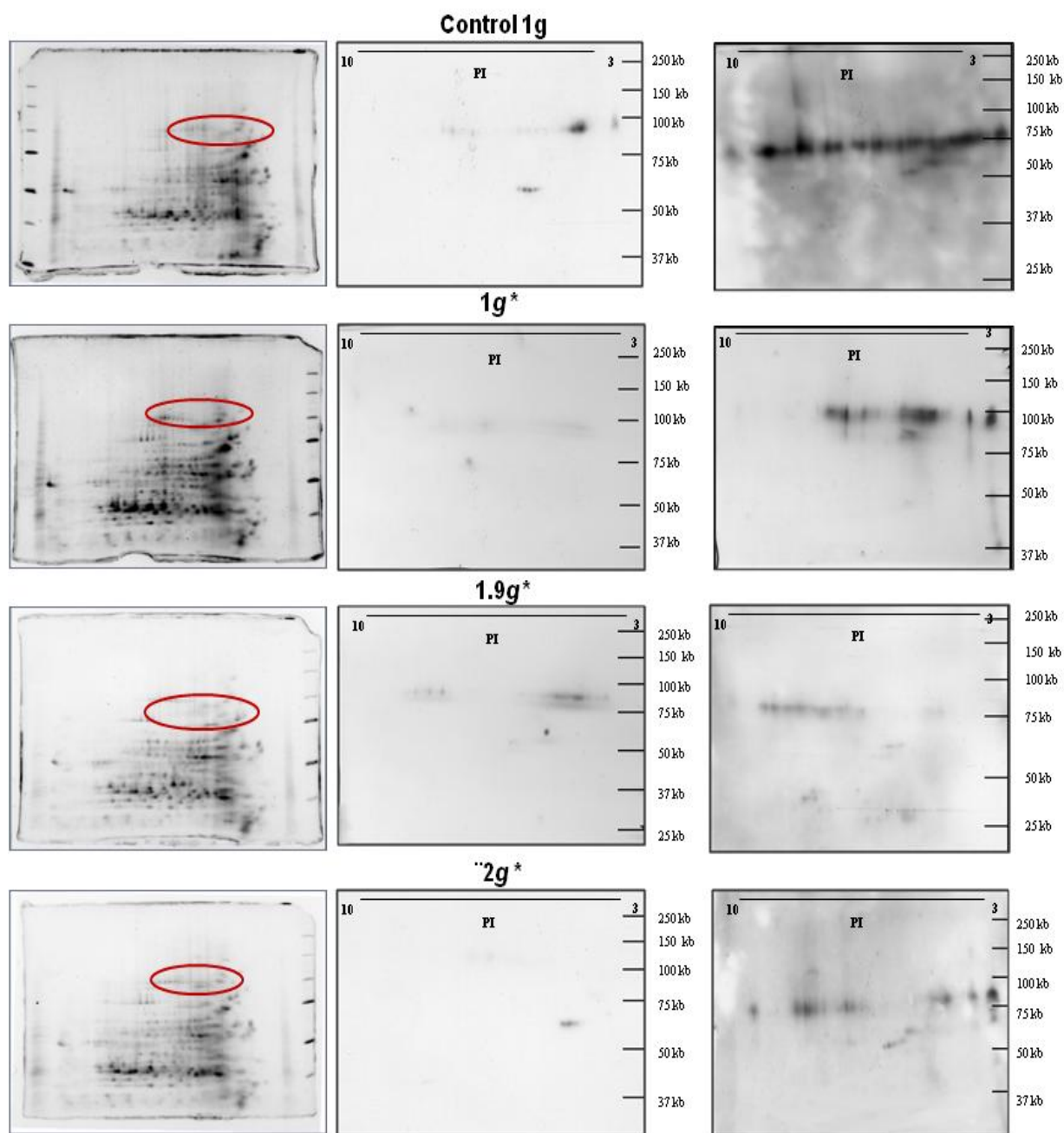


Figura 93b. Geles bidimensionales y *Western-blot* (AtNuc-L1) en Levitación magnética. Se representan los geles bidimensionales de proteínas totales en los controles de Levitación magnética (1g/1g*) y las posiciones de hipergravedad simulada (1,9g*/2g*); a) Proteínas totales en geles bidimensionales. La proteína AtNuc-L1 se representa en los geles marcada con una circunferencia roja. b) *Western-blot* con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región GAR de la nucleolina (dilución 1:2000). c) *Western-blot* con un anticuerpo anti-AtNUC-L1 obtenido contra la región RRM (dilución 1:1000).

DISCUSIÓN

- 1. Cambios inducidos por la Gravedad Alterada en los procesos de Proliferación y Crecimiento Celular**
- 2. Efectos globales de la Gravedad Alterada a Nivel Molecular**
- 3. Alteraciones del Ciclo Celular y de su Regulación Hormonal inducidas por las condiciones de Gravedad Alterada**
- 4. Nuevas herramientas y perspectivas para futuros experimentos en Microgravedad Real en la Estación Espacial Internacional**

DISCUSIÓN

1. Cambios inducidos por la Gravedad Alterada en los procesos de Proliferación y Crecimiento Celular

1.1. Efecto comparado de la microgravedad simulada sobre el crecimiento y la proliferación celular en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en distintos simuladores

En condiciones de microgravedad simulada por Levitación magnética se observa el desacople entre la proliferación y crecimiento celular, en las células del meristemo radicular. En condiciones de gravedad control, estos dos procesos se encuentran estrechamente asociados en células meristemáticas. Encontramos un aumento en la proliferación celular, medida indirectamente a partir del nº células/mm en las filas de células del meristemo, donde observamos mayor cantidad de células con un tamaño reducido (Manzano *et al.*, 2009). Sin embargo la ciclina B1, proteína clave en la transición G2/M y por tanto, marcador de la proliferación celular (Criqui *et al.*, 2000), disminuye. En condiciones normales la expresión constitutiva de ciclina B1 promueve la división celular incrementando el crecimiento de la raíz (Schnittger *et al.*, 2002). Un método habitual para evaluar la proliferación celular es medir el índice mitótico de las células de una determinada población. Sin embargo, unos autores afirman que el índice mitótico disminuye en plantas crecidas en microgravedad (Barmicheva *et al.*, 1989), mientras que otros autores han observado lo contrario (Darbelley *et al.*, 1989). Realmente, el índice mitótico no es un buen método para medir la tasa proliferativa de una población, ya que un ciclo celular acelerado con fases muy cortas se asocia con un índice mitótico bajo, es decir, que no por detectar una baja proporción de células dividiéndose significa que exista poca proliferación celular. Es por ello que hemos utilizado diferentes tipos de medidas y de marcadores para valorar el estado proliferativo de la población lo mejor posible (Matía *et al.*, 2005; 2007).

Por otra parte, encontramos una disminución del tamaño nucleolar y una disminución en los niveles de nucleolina, que indican una disminución en los niveles de transcripción y en el procesamiento del pre-RNA ribosómico (pre-rRNA; Sobol *et al.*, 2005) y, consiguientemente, una menor síntesis de proteínas. Todo ello nos indica que

la célula se divide antes de tiempo sin alcanzar el tamaño celular necesario, y sugiere que existe alguna alteración en los puntos de control del ciclo celular. Por otra parte nuestros resultados sugieren que se mantendría el fenómeno de “compensación celular”, según el cual el número de células es inversamente proporcional al tamaño celular, para que los órganos tengan el tamaño adecuado (Tsukaya, 2006).

El efecto de la microgravedad simulada en el Levitador magnético provoca efectos similares a los obtenidos en la RPM y en el experimento “ROOT” en la ISS, aunque se detectan más débilmente porque el propio campo magnético ejerce efectos en la misma dirección sobre los parámetros estudiados (Manzano *et al.*, 2009).

A nivel global existe controversia sobre el efecto que produce la microgravedad real o simulada sobre el crecimiento y la elongación de las plantas, especialmente relacionados con la duración de la exposición a la microgravedad. Algunos autores defienden que las plántulas son más largas en el espacio que en la Tierra (Hilaire *et al.*, 1996) y otros han observado que son más cortas (Iversen *et al.*, 1996). En nuestros experimentos en levitación magnética hemos encontrado una disminución en la longitud de las plántulas a 2 días de crecimiento y un aumento de este parámetro a cuatro días (al igual que en experimentos previos en la RPM y en la ISS). Se ha sugerido que la controversia de los resultados puede deberse a la acción del etileno, que ha estado presente en condiciones saturantes en numerosos experimentos espaciales anteriores a la utilización de la ISS. El etileno tiene un efecto hormonal en las plantas, actuando sobre el crecimiento, provocando una disminución en la longitud y dando lugar a cambios morfológicos (pérdida de la dominancia apical, rápido crecimiento de raíces secundarias, anomalías en la estructura del hipocotilo, etc.). Perbal (2001) describe que las raíces de las plántulas crecidas durante uno o dos días en condiciones de microgravedad muestran una longitud similar a las crecidas en tierra; sin embargo si crecen de tres a cinco días, las raíces son más largas. Finalmente si se prolonga el crecimiento más de cinco días se obtienen raíces más cortas que en 1g. Los resultados de nuestro laboratorio (incluidos los presentados en este trabajo), en relación con el desacople entre crecimiento y proliferación celular, manifestado también en la longitud de las raíces, corroboran esta interpretación de una diferente respuesta según el tiempo de exposición a la microgravedad, real o simulada.

Buscando validar los resultados anteriores con otra técnica, cuantificamos por PCRq, a nivel de plántula completa, la expresión de los genes de la ciclina B1 (marcador de división celular) y de la nucleolina L1 (marcador indirecto del crecimiento celular). Los resultados que obtuvimos por PCRq en los niveles de expresión de estos dos genes fueron coherentes con las técnicas de biología celular (por inmunocitoquímica y cuantificación de la D.O.I.), aunque no reflejaron el estado de las células meristemáticas de la raíz, sino el de los cotiledones, debido a la muy diferente proporción de uno y otro tejido en relación a la plántula completa.

1.2. Comparación entre plántulas crecidas en condiciones de hipergravedad en dos simuladores basados en diferentes fuerzas físicas

Cuando comparamos los resultados obtenidos en hipergravedad 2g, obtenida por centrifugación, con los obtenidos en la posición complementaria a la de levitación magnética (2g*) se obtienen en general alteraciones similares (Tabla 16). Sin embargo existen también algunas diferencias; por ejemplo, en la Centrífuga no se produce un aumento en la longitud de las plántulas a dos días de crecimiento como en el Levitador, pero sí a los cuatro días. Sin embargo, en el caso de la LDC obtenemos una menor cantidad de células por mm a dos días de crecimiento, lo que indica una menor tasa de división celular, a diferencia de los que ocurre en el Levitador, aunque a los cuatro días observamos que estas diferencias en proliferación se desvanecen en ambos simuladores. Resaltamos no obstante que la mayoría de los efectos se dan en la misma dirección, como la expresión de la ciclina B1, que sigue los mismos patrones en ambos simuladores aumentando a los dos días y disminuyendo a los cuatro y el tamaño nucleolar se encuentra disminuido en hipergravedad al compararse con el control 1g aunque aumenta con respecto al control rotacional.

Concluimos que la Centrífuga produce un efecto parecido al observado en el Levitador magnético (2g*) y que las diferencias encontradas entre ambos aparatos se deben principalmente a efectos colaterales causados por factores físicos distintos de la gravedad, que son diferentes entre ambas tecnologías, sobre todo al efecto que causa el

elevado campo magnético y a las vibraciones y cambios de temperatura ejercidos en la Centrífuga. Queremos enfatizar que, aunque se encuentran diferencias significativas en hipergravedad, los efectos no son de una magnitud tan alta como los descritos en microgravedad simulada. Por lo tanto, la hipergravedad causa una desregulación menor en nuestro sistema de estudio.

Si tenemos en cuenta sólo el control rotacional, encontraríamos un efecto contrario al encontrado en microgravedad simulada ($0g^*$), es decir, disminución en la tasa de proliferación celular (aumento en la expresión de la ciclina B1, marcador de la fase G2/S) y aumento en el tamaño nucleolar, apreciable principalmente a dos días de crecimiento. Resultados similares fueron encontrados por Soto *et al.* (2007) en experimentos realizados con *S. pombe* en condiciones de hipergravedad, donde se obtenían alteraciones en el crecimiento celular debidas a modificaciones en el ciclo celular, por retenciones temporales en la fase G2/M. Estas alteraciones se asociaron con movimientos en los filamentos de actina en la punta de estas células dependientes de la quinasa Sty-1. Experimentos sobre los niveles de expresión de *CYCB1;1* en el mutante *tonsoku* de *Arabidopsis*, indican que un estado prolongado en fase G2, por activación de proteínas inhibitoras de la división celular, produce un aumento en la acumulación de la ciclina B1 (Suzuki *et al.*, 2005).

Un resultado muy llamativo fue el aumento significativo en la anchura radicular en varios tratamientos de hipergravedad. Una posible explicación de este efecto fue propuesta por Soga (2004); la hipergravedad induce que la célula produzca un corto, grueso y rígido tabique celular para oponerse a la resistencia que ejerce la fuerza gravitacional extra. Para ello la hipergravedad reorienta los microtúbulos corticales de células epidérmicas de hipocotilos en *Arabidopsis*, reforzando la hipótesis de que los microtúbulos son claves para mantener un crecimiento normal contra la fuerza gravitacional y donde los mecanorreceptores también están implicados (Hoson *et al.*, 2010; Soga *et al.*, 1999). Se ha observado en otros experimentos, que la hipergravedad produce cambios y perturbaciones en la superficie de las células, en las vías de señalización celular y en los movimientos intracelulares de los orgánulos (Ingber, 2006; Monshausen y Sievers, 2002; Nickerson *et al.*, 2004). La pared celular aumenta su rigidez por una mayor acumulación de xiloglucanos y por consiguiente se produce un

hinchamiento de la pared celular (Soga, 2004). Se ha comprobado, en *Arabidopsis thaliana*, que la hipergravedad induce un aumento en la lignificación de la pared celular secundaria (Tamaoki et al., 2006).

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos con la línea CYCB1;1:GUS crecida en hipergravedad 2g y 6g en comparación con el resultado de la posición 2g* en el interior del Levitador magnético

Parámetros	Días de crecimiento	2g vs		6g vs		Control 1g vs	2g* vs		Control 1g vs
		1g	C. rot	1g	C. rot	C. rot	1g	1g*	1g*
Longitud de las plántulas	2d	=	=	=	=	+	++	++	=
Tasa de proliferación celular		--	--	--	--	=	+	=	+
Expresión de Ciclina B1		++	++	=	+	=	=	++	-
Biogénesis de ribosomas (Tamaño nucleolar)		-	++	-	++	--	=	=	=
Parámetros	Días de crecimiento	2g vs		6g vs		Control 1g vs	2g* vs		Control 1g vs
		1g	C. rot	1g	C. rot	C. rot	1g	1g*	1g*
Longitud de las plántulas	4d	++	=	++	=	++	++	=	+
Tasa de proliferación celular		=	=	=	--	=	=	=	=
Expresión de Ciclina B1		--	--	--	--	=	--	-	-
Biogénesis de ribosomas (Tamaño nucleolar)		-	++	--	++	--	-	=	=
Diferencias: ++/-- fuertes		+/- leves		= sin diferencias					

1.3. Comparación de resultados obtenidos en meristemos radiculares y los encontrados en cultivos celulares sólidos de *Arabidopsis*, sometidos a diferentes simuladores de gravedad alterada

Aunque el objetivo inicial de la utilización de células proliferantes procedentes de cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* era ampliar nuestros estudios a la realización de técnicas moleculares que demandan más cantidad de material proliferante, era también de gran importancia comprobar en qué medida los procesos celulares implicados en nuestro principal sistema de estudio, la proliferación y el crecimiento celular, están alterados en el modelo en cultivo, utilizando los mismos parámetros que se habían empleado en los estudios sobre el meristemo radicular. Por una parte, este dato validaría los resultados moleculares que se pretendían obtener, en un contexto de alteración de funciones celulares más o menos próximo al encontrado en el meristemo radicular y, por otra parte, el dato en sí era interesante al poder comparar dos sistemas de células proliferantes sometidos a diferentes mecanismos de regulación.

En primer lugar, cuantificamos el tamaño nucleolar e hicimos un análisis ultraestructural para estudiar el nucleolo por microscopía electrónica, atendiendo a parámetros morfofuncionales indicativos de la tasa de crecimiento celular. Los resultados que obtuvimos respecto al tamaño nucleolar son similares a los encontrados en el meristemo radicular de plántulas. Se encontró una disminución en el tamaño nucleolar en la RPM, ya observada en células meristemáticas, en experimentos previos con plántulas *CYCB1:uidA* (Matía *et al.*, 2007). En la Centrífuga el resultado fue opuesto al de la RPM, aumentando el tamaño nucleolar, y similar a las plántulas crecidas durante 2 y 4 días en la Centrífuga, al compararse con el control rotacional. Sin embargo en el Levitador no encontramos diferencias significativas en el tamaño nucleolar a diferencia de lo que ocurre en plántulas. Estas diferencias pueden estar asociadas con la presencia de mecanismos específicos de detección y transducción de la señal gravitatoria en la raíz que no están presentes en las células del cultivo. Respecto de la ultraestructura del nucleolo, se detectaron tres modelos estructurales a los que pudo asignarse un significado funcional; la cuantificación de los diferentes modelos en diferentes condiciones de gravedad alterada indicaba una disminución de la actividad nucleolar en microgravedad y un ligero aumento en hipergravedad. Los resultados de

microgravedad están en la misma línea de resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Matía *et al.*, 2007; 2010; Sobol *et al.*, 2005) y la discreta estimulación de la actividad encontrada en hipergravedad es un resultado totalmente nuevo.

Para determinar el estado proliferativo del cultivo utilizamos la técnica de citometría de flujo, observándose un aumento en el número de células que entran en fase S/G2, tanto en microgravedad simulada por RPM o por levitación. En hipergravedad (LDC), el porcentaje de células en cada etapa del ciclo es similar al control y las diferencias encontradas en 2g* (Levitador) son debidas principalmente al campo magnético (equivalentes a las de 1g*). Las alteraciones en el ciclo provocadas por el campo magnético parecen enmascarar los efectos de la microgravedad simulada.

Así pues, se observa una tendencia similar respecto de los cambios provocados por la gravedad alterada en parámetros indicadores del crecimiento y la proliferación celular, tanto en células meristemáticas de la raíz, como en células proliferantes en cultivo *in vitro*. Esto es así a pesar de que la agregación de células que conforman el callo no constituye un tejido real, ni forman parte de un órgano, a diferencia de lo que sucede en las células meristemáticas de la raíz. Las señales de transducción intracelulares que se desencadenan entre las células de las plantas, ante determinadas condiciones ambientales, no suceden entre las células que forman el callo (Cools *et al.*, 2010), por lo que la respuesta a la gravedad alterada que hemos observado es independiente de la respuesta especializada a la señal mecánica gravitatoria que median los estatolitos y que está vinculada al transporte de auxinas. Así pues, deben destacarse las diferencias entre un sistema y otro en cuanto a los mecanismos perceptores de la gravedad, en cuanto a la integración o no en los grandes mecanismos reguladores que afectan a la planta completa e incluso en cuanto al tiempo de exposición a la gravedad alterada (Tabla 17).

A partir de aquí, y teniendo en cuenta estas diferencias entre el sistema plántula y el sistema cultivo, profundizamos en el estudio de las alteraciones de los procesos celulares en el cultivo, mediante el análisis de genes relevantes. Para ello extrajimos datos de los genes de la ciclina B1, nucleolina y fibrilarina del análisis transcriptómico por *microarrays* y los validamos por PCRq. En muestras sometidas a microgravedad simulada en la RPM no encontramos estos genes desregulados mediante la técnica de

microarrays, pero sí por PCRq. Obtuvimos una disminución en los niveles de expresión de *CYCBI;1*, acorde con los resultados obtenidos en plántulas. Se observó un aumento en la expresión de *AtNUC-L1* y *AtFIB1*, indicando un aumento de expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis de ribosomas (Cerdido y Medina, 1995; Medina *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque se transcribe mayor cantidad de estas proteínas, el tamaño nucleolar es menor, al igual que la cantidad de nucleolina encontrada en el nucleolo en células del meristemo radicular (Matía *et al.*, 2007). Una vez más, observamos una desregulación en algún punto del ciclo celular que produce una disminución del tamaño nucleolar, lo cual apoya la teoría del desacople entre proliferación y crecimiento celular, también en el sistema de callos en cultivo. En la Centrifuga encontramos algunas alteraciones en genes claves del ciclo celular (en todas las etapas del ciclo celular) y en genes relacionados, que sufren un aumento de expresión. Por PCRq observamos un aumento en la expresión de *CYCBI;1*, de manera similar a lo que hemos encontrado en el meristemo radicular de plántulas con la construcción *CYCBI:uidA*. A nivel global no se producen alteraciones del ciclo celular, aunque sí existen bastantes genes desregulados implicados en dicho ciclo que serán discutidos más adelante. En cuanto al nucleolo, se produce un aumento de tamaño, tanto en plántulas como en el callo, acorde con el aumento de expresión de *AtFIB1*. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en la expresión de *AtNUC-L1*.

Tabla 17. Características diferenciales de los dos sistemas celulares de estudio	
Células meristemáticas de la raíz en plántulas completas (<i>in vivo</i>)	Cultivo celular inmovilizado en placa de agar (<i>in vitro</i>)
Asociadas a órganos especializados para la detección de la gravedad (columela)	Son células indiferenciadas , por lo que no hay ningún órgano ni tejido especializado en percibir la gravedad
Presentan respuesta tisular a la gravedad alterada (mediada por la graviestimulación en células especializadas y la transducción de esta señal), además de los mecanismos generales de mecanosensibilidad celular	Aparentemente no poseen orgánulos mecanorreceptores (como los estatolitos), aunque deben tener algún mecanismo de mecanosensibilidad celular
Sistema natural (<i>in planta</i>)	Sistema artificial (en cultivo <i>in vitro</i>)
Número limitado de células proliferativas en un entorno de células diferenciadas	Abundante biomasa en estado proliferativo , permitiendo la realización de técnicas moleculares (genómica y proteómica)

En el caso del Levitador encontramos diferencias significativas en genes de ciclo celular y genes relacionados. En la posición $0g^*$ se observa una disminución de expresión en genes relacionados principalmente con la fase G2/M y en posición $2g^*$ la disminución en algunos genes del ciclo celular. Por PCRq se detecta una disminución significativa de *CYCBI* en la posición $2g^*$. No encontramos una disminución en el tamaño nucleolar, a diferencia de lo que ocurre en plántulas, pero sí obtenemos una disminución en proteínas ribosómicas en la posición $0g^*$ (en los resultados de *microarrays*). Por otro lado, encontramos un aumento de expresión de *AtNUC-L1* y no de *AtFIB1* en muestras sometidas al campo magnético $1g^*$ y en la posición intermedia, $1,9g^*$. Concluimos que el campo magnético produce alteraciones en la desregulación del ciclo celular en el mismo sentido que los producidos por microgravedad simulada, por lo que el efecto es más difícil de observar. Aun así, en muestras sometidas al mismo tiempo a ambos efectos (alteraciones gravitatorias y campo magnético) se observan alteraciones génicas en nuestros procesos de interés. No obstante, los efectos que observamos en micro- e hiper-gravedad en los callos en cultivo son de menor magnitud que los encontrados en plántulas.

En resumen, los resultados obtenidos en ambos sistemas de estudio son muy similares y las alteraciones son de menor intensidad en el caso de los cultivos celulares. Esta similitud de resultados entre meristemo y cultivo *in vitro* respalda la utilización de este último como sistema modelo en el que realizar un análisis completo de los efectos globales de la microgravedad en la proliferación y el crecimiento celular en cuanto a los mecanismos celulares y moleculares implicados. Sin embargo, el paralelismo entre meristemo y cultivo debe tener siempre en cuenta las diferencias muy importantes existentes entre las células de uno y otro sistema, que se han mencionado anteriormente. En cualquier caso, el hecho de que se hayan encontrado diferencias en los parámetros estudiados en el cultivo celular entre las condiciones de gravedad alterada y los controles demuestra por sí solo que las células proliferantes del cultivo son capaces de detectar cambios en la gravedad y valida el cultivo celular *in vitro* como un sistema adecuado para estudiar los efectos de la gravedad sobre la proliferación celular.

1.4. Efectos sinérgicos asociados a las condiciones de cultivo

1.4.1. Efectos del campo magnético sobre el crecimiento de las plántulas

El fuerte campo magnético en cuya presencia ocurre el crecimiento de las plántulas provoca algunos cambios en nuestro sistema de estudio, ocasionando un aumento en la proliferación celular y en el tamaño de las plántulas a diferentes días de crecimiento. Algunos autores han mostrado que un campo magnético de baja intensidad ejerce un efecto positivo en las plantas, incrementando la tasa de germinación de semillas y su crecimiento (Savostin, 1930; Kavi, 1983; Vashisth y Nagarajan, 2008). Estudios realizados por Flórez *et al.* (2007) sobre el efecto de un campo magnético de 125-250 mT, 100 veces más débil que el que hemos utilizado para la levitación, en la germinación de semillas de maíz, han dado resultados muy similares, corroborando que se produce un incremento en la tasa de germinación de semillas de maíz y en la longitud de las plántulas.

Por otra parte, hemos observado en nuestros experimentos que el campo magnético aplicado no es capaz de levitar los gránulos de almidón de las células de la columela, aunque obtenemos resultados similares a los obtenidos en otros simuladores de microgravedad, indicando que las condiciones de ingravidez creadas son detectadas por las células meristemáticas de la raíz aunque se mantenga el gravitropismo. Se han realizado experimentos con la aplicación de campo magnético para estudiar la gravipercepción de las células de la columela y por lo tanto de la curvatura de la raíz; por ejemplo Kuznetsov y Hasenstein (1996) demostraron que el efecto que causa la aplicación de un elevado campo magnético sobre las células de la columela alteraba la posición de los estatolitos como el vector gravedad terrestre. Estos autores realizaron experimentos de aplicación de un campo magnético sobre muestras sometidas a microgravedad simulada en un clinostato y demostraron que el campo magnético era capaz de provocar una curvatura de la raíz de manera similar a la causada en condiciones de gravedad terrestre. Nosotros encontramos un efecto diferente, donde el campo magnético aplicado no produce la levitación de los estatolitos porque no es lo suficientemente fuerte. Sin embargo, un campo magnético más elevado podría provocar

la levitación de los gránulos de almidón de los estatocitos (Richard Hill, comunicación personal).

1.4.2. Comparación entre plántulas sometidas a levitación magnética a diferente concentración de sacarosa

Por razones de coherencia con experimentos anteriores en microgravedad real o simulada, decidimos llevar a cabo los experimentos con plántulas en el Levitador magnético en ausencia de luz. Como es ampliamente conocido, la luz es la fuente de energía esencial para las plantas. Ciertamente, el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las plántulas etioladas en el Levitador contenía sacarosa como fuente de energía, pero podría plantearse la pregunta de si la cantidad de energía disponible con una concentración de sacarosa del 10% (p/v) podría ser limitada y cómo podría influir en la respuesta celular al estrés gravitatorio en estas condiciones un incremento de esa energía disponible.

Así pues, decidimos realizar experimentos complementarios añadiendo un suplemento de sacarosa al medio de cultivo, incrementando su concentración del 10% al 30%. Es bien conocido que la sacarosa se hidroliza fácilmente a glucosa y que esta molécula, como fuente de energía, es un potenciador y regulador del ciclo celular, que actúa activando algunas proteínas claves en la regulación del ciclo, como es el caso de las ciclinas tipo D, estimulando la progresión del ciclo en fase G1 (Caroline *et al.*, 2002; Cockcroft *et al.*, 2000; Gaudin *et al.*, 2000; Inze y De Veylder, 2006; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). De la misma manera, activa la expresión de algunos genes en la transición G2/M, como son *CYC1;1* y *CDK1;1*, en tejidos meristemáticos (Skylar *et al.*, 2011). Además, la sacarosa es un importante activador de la biogénesis de los ribosomas, induciendo, entre otros, la expresión del gen de la nucleolina (Kojima *et al.*, 2007). Todo esto indica que una mayor fuente de energía en el medio favorece la proliferación celular. Experimentos llevado a cabo por Price *et al.* (2004) demostraron que en plantas con elevados niveles de azúcares intracelulares, se disminuye la producción de etileno y se favorece la biosíntesis de almidón, la asimilación del nitrógeno, la expresión de genes relacionados con el estrés, la transcripción y la biosíntesis. Por el contrario una

disminución en la concentración celular de azúcares, produce un aumento en la expresión de genes fotosintéticos, en movilización de recursos energéticos y en degradación de lípidos, almidón y proteínas (Ho *et al.*, 2001; Koch, 1996).

En nuestros experimentos observamos que un aumento en la concentración de sacarosa en el medio altera la sensibilidad del sistema de la proliferación y el crecimiento celular a las variaciones en el vector gravedad. En condiciones de aumento de sacarosa, el campo magnético produce un efecto más suave pero contrario al estudiado anteriormente con plántulas de 2 días de crecimiento ($1g^*$), apareciendo una inesperada disminución en la proliferación celular (a pesar que los azúcares potencian la división celular) y un aumento en el crecimiento celular (también observado en las otras dos posiciones). Sin embargo este efecto es menor en las condiciones de gravedad simulada efectiva, debido a la propia influencia de micro- e hiper-gravedad simulada. A los 4 días de crecimiento las plántulas se aclimatan a las nuevas condiciones de cultivo (aumento en la concentración de sacarosa), volviéndose a observar los efectos encontrados en experimentos anteriores a concentraciones estándar de sacarosa (en ambas situaciones de gravedad alterada).

Los resultados de este experimento muestran que, en general, los parámetros ambientales que definen el experimento (presencia de nutrientes, fuerzas inerciales o magnéticas, vibraciones, temperatura) influyen en la sensibilidad del sistema frente a un cambio en la gravedad, enmascarando los efectos del estrés gravitatorio en un sentido o en otro (potenciación o suavización) y en mayor o menor medida. La realización de experimentos con gravedad alterada en condiciones de estrés ambiental adicional (ausencia de luz o presencia de campos magnéticos) puede hacer más visible un efecto que en condiciones de cultivo óptimas no es evidente. Un efecto similar se ha observado en otros sistemas modelo expuestos a microgravedad en la ISS en condiciones de cultivo subóptimas (Herranz *et al.*, 2010).

2. Efectos globales de la Gravedad Alterada a Nivel Molecular

2.1. Comparación de los efectos globales detectados a nivel genómico y proteómico

Las células de las plantas que no forman parte de tejidos especializados en la recepción de estímulos mecánicos podrían sentir la gravedad independientemente de las células especializadas de la columela del meristemo radicular. Un posible mediador podría ser el citoesqueleto, en contacto con orgánulos celulares como los plastidios (amiloplastos) o el núcleo, que controla la orientación de los orgánulos (la orientación es dependiente de energía; Menand *et al.*, 1998). En experimentos realizados por Hampp *et al.* (1997) con protoplastos en cultivo en un vuelo parabólico se observaron alteraciones a nivel energético redox. Las alteraciones en el vector gravedad se transmitían a los orgánulos de las células, produciéndose cambios en el metabolismo celular y cambios a nivel genético y proteómico (Martzivanou *et al.*, 2006).

2.1.1. Efecto de la gravedad alterada a nivel transcriptómico en cultivos celulares sólidos de *Arabidopsis thaliana*

La exposición de cultivos celulares a condiciones de crecimiento que incluyen la presencia de un elevado campo magnético (posición 1g* del Levitador) produce cambios a nivel genético. Hemos encontrado un total de 105 alteraciones génicas de más de 44.000 sondas utilizadas, con un pval-Limma < 0,01 y un fold change > 0,5. Paul *et al.* (2006) expusieron plantas de *Arabidopsis* a una intensidad de campo magnético de 21 Tesla durante diferentes tiempos de exposición (desde 2,5h a 6,5h). Como resultado obtuvieron 114 genes alterados de un total de 8.000 y con un fold change >2,5. Ambos resultados son similares aunque de menor intensidad en nuestro caso. Las diferencias encontradas entre ambos, pueden deberse a las diferencias experimentales, donde el material (plántulas *versus* callos), el tiempo de exposición (único en nuestro caso) y la intensidad del campo magnético (hasta 20 Tesla en su caso) no son las mismas.

Otros estudios sobre el efecto del campo magnético demuestran que produce un aumento de estrés oxidativo en la célula, que se traduce en un aumento en la cantidad de radicales libres y un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se producen cambios en la actividad enzimática, en la expresión génica y en las concentraciones de calcio, afectando a la membrana, al crecimiento y aumentando la muerte celular (Sahebamei *et al.*, 2007). En nuestros resultados hemos encontrado un aumento de la actividad peroxidasa en las posiciones del Levitador magnético (Tabla 1 de material suplementario en soporte electrónico), indicando alteraciones a nivel metabólico, en la actividad catalítica y en los componentes celulares, como se observa en los grupos sobre-representados de los grupos ontológicos. Experimentos con plántulas de *Arabidopsis thaliana* a diferentes días de crecimiento en un clinostato 3-D dieron resultados similares (Sahebamei *et al.*, 2007).

En experimentos realizados por Paul *et al.* (2006) sobre la alteración que causa el campo magnético en el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis*, se encontraron afectados los grupos ontológicos correspondientes a alteraciones en la pared celular, en la actividad catalítica, en el metabolismo secundario y en procesos biosintéticos. Sin embargo, los grupos más afectados para cada una de las condiciones del Levitador magnético, no son iguales en todos los casos. En el caso de microgravedad simulada $0g^*$, se observan principalmente afectados genes relacionados con la pared celular, el citoesqueleto y con estructuras de encapsulación. Todo ello puede estar relacionado con las alteraciones que se producen cuando las células sienten la pérdida de gravedad ocasionada por la Levitación magnética, en los que sólo se produce la levitación de sustancias en disolución acuosa (Christianen, 2010; Hill, 2010; Martzivanou *et al.*, 2006).

El experimento en la Centrífuga mostró alteraciones en la transcripción, a nivel metabólico, en la formación y reorganización de la pared celular, en mecanismos de defensa y respuesta a estrés y en transporte, además de otros grupos. Resultados similares fueron encontrados por Martzivanou y Hampp (2003) al someter callos procedentes de *Arabidopsis thaliana* a un aumento de la fuerza gravitatoria de 5 veces la gravedad terrestre (5g). Experimentos en hipergravedad a 7g producen un aumento en la síntesis de hormonas típicas de respuesta a estrés, como etileno y ABA (Martzivanou

y Hampp, 2003), produciéndose además un aumento del metabolismo secundario, también como reacción de defensa o de respuesta al estrés. Estas alteraciones, como reflejan los resultados del análisis de ontología, también han sido encontradas en nuestros experimentos de hipergravedad (2g y 2g*), donde observamos una clara relación entre ambas condiciones de gravedad en los procesos afectados, aunque en el caso de la Centrífuga exista una mayor cantidad de procesos o funciones alteradas. Curiosamente esta respuesta al estrés, como el aumento del metabolismo secundario y el de los procesos biosintéticos, también ha sido encontrada en las muestras sometidas únicamente al campo magnético, en la posición 1g*, como consecuencia del estrés que ocasiona dicho campo.

Los efectos encontrados en microgravedad simulada por la RPM están claramente relacionados con los diferentes tipos de respuesta al estrés. El número de grupos ontológicos alterados encontrados en ambas situaciones de microgravedad simulada (RPM y 0g* del Levitador) es similar, aunque los grupos ontológicos más afectados no son exactamente los mismos. Posiblemente estas diferencias se deban sobre todo a los mecanismos físicos en los que se diferencian ambas técnicas (Paul *et al.*, 2006; Moseyko *et al.*, 2002).

En las posiciones del Levitador magnético hemos observado que existen diferencias en los grupos génicos más afectados entre las diferentes posiciones. Realmente del total de sondas alteradas en las distintas posiciones, existe un bajo porcentaje (aproximadamente un 10%) de genes alterados que coinciden. En todos los casos estos genes están igualmente desregulados (aumentan o disminuyen coherentemente en las dos posiciones), y principalmente están relacionados con genes de respuesta a estrés por el elevado campo magnético, como alteraciones a nivel de transcripción y de metabolismo, como ya observaron Paul *et al.*, (2006). El resto de alteraciones génicas se deberían a los efectos de gravedad alterada. Sin embargo, cuando analizamos el efecto a nivel transcriptómico global, mediante la herramienta informática de GEDI, observamos dos tipos de efectos, por un lado un fuerte efecto del campo magnético, muy similar en todas las posiciones, y por otro lado un efecto mucho más suave que se debe a la condición de gravedad efectiva en cada condición. Este análisis permite detectar alteraciones génicas muy tenues, que normalmente no se

consideran significativas en análisis estadísticos que evalúan cada gen individualmente, pero que sí son válidas cuando evaluamos muchos genes que se comportan de la misma forma (como un solo *cluster* o píxel en la imagen). Por tanto, estos resultados hay que interpretarlos visualmente a nivel global, como un efecto de ajuste de la expresión génica celular en condiciones ambientales diferentes a las terrestres. Hemos localizado un efecto de ajuste del genoma opuesto entre micro- e hiper-gravedad alterada a nivel de expresión global, que se observa mejor comparando la posición $1,9g^*$ y la RPM, pero que también se pone de manifiesto por el parecido entre las posiciones $0g^*$ y $0,1g^*$ y las posiciones $1,9g^*$ y $2g^*$. Estos resultados sugieren que existe una respuesta global de la célula que se adapta a las condiciones ambientales ajustando suavemente algunos procesos biológicos y genes de estrés abiótico, que se comportan de manera opuesta en las condiciones de micro- e hiper- gravedad simulada, como también se ha observado que ocurre en otros sistemas modelo (Herranz *et al.*, 2010).

Las diferencias encontradas entre los diferentes simuladores se deben principalmente a las diferentes tecnologías utilizadas. El campo magnético por sí solo produce alteraciones a nivel génico (Paul *et al.*, 2006), al igual que sucede cuando se aplica una fuerza mecánica. Experimentos realizados por Moseyko *et al.* (2002), llevaron a la conclusión de que las fuerzas mecánicas aplicadas sobre el crecimiento de las plantas provocan cambios en la pared celular, respuestas de resistencia a enfermedades (estrés biótico) y alteraciones sobre la síntesis de proteínas relacionadas con el ion calcio y con el citoesqueleto.

Existe una relación entre los grupos ontológicos que se han encontrado modificados en nuestras condiciones de gravedad alterada y nuestros resultados de ciclo celular. En experimentos realizados por Menges *et al.* (2002) sobre ciclo celular en cultivos de *Arabidopsis* sincronizados se demostró que existe una amplia cantidad de genes que tienen regulada su expresión dependiente de la progresión del ciclo celular. Estos genes forman parte de un gran cantidad de procesos celulares, como el propio control del ciclo celular, cambios en el citoesqueleto, transcripción, proteólisis, fosforilación, transducción de señales, biosíntesis, metabolismo del carbono y de aminoácidos, respuesta a hormonas, y en las funciones de los orgánulos.

Los experimentos realizados en callos de *Arabidopsis* sometidos a gravedad alterada durante unas horas de exposición sugirieron que la RPM es más comparable, en estudios de expresión génica, a Levitación magnética, que al clinostato 2-D. Sin embargo, los resultados del clinostato 2-D estuvieron más relacionados con la Centrífuga (Babbick *et al.*, 2007). En nuestro caso, si consideramos el estudio a nivel transcriptómico global mediante el análisis “GEDI”, observamos una mayor similitud entre el simulador de fuerza mecánica RPM y el Levitador magnético. Sin embargo al estudiar los genes estadísticamente significativos, observamos una mayor aproximación entre los grupos alterados de la Centrífuga con los del Levitador magnético, posiblemente debido al bajo porcentaje de genes con cambios importantes que se producen en la RPM.

2.1.2. Efecto de la gravedad alterada sobre el perfil proteómico en cultivos celulares sólidos de *Arabidopsis thaliana*

En nuestros experimentos proteómicos observamos una mayor cantidad de proteínas alteradas en cuanto a su síntesis (*sensu stricto*, en cuanto a sus niveles detectables por electroforesis) en levitación magnética que en la Centrífuga o en la RPM. El efecto encontrado en levitación se debe principalmente al campo magnético, puesto que, cuando restamos su efecto, el número de alteraciones que permanece es mucho menor. Realmente, la cantidad de proteínas que aparecen alteradas en cuanto a su síntesis con respecto a la expresión de sus respectivos genes, es mucho menor. Así pues, nuestros resultados muestran una desregulación génica mucho mayor de la que podemos observar a nivel de alteraciones proteómicas.

Las proteínas alteradas que hemos conseguido identificar están relacionadas con metabolismo primario, homeostasis de iones, traducción y plegamiento de proteínas, vías de señalización, citoesqueleto y pared celular. La mayoría de estos grupos ya han sido relacionados con microgravedad alterada en experimentos previos (Barjaktarovic *et al.*, 2007; Barjaktarovic *et al.*, 2009) en geles bidimensionales de proteínas en callos de *Arabidopsis thaliana*, aunque estos autores encontraron 18 alteraciones cuantitativas en hipergravedad (8g) y 25 proteínas en la RPM. Estas proteínas estaban relacionadas con

desintoxicación de ROS, metabolismo primario, vías de señalización, proteínas de traducción y proteólisis y con la homeostasis de iones. Nuestros resultados con simuladores de fuerza mecánica nos dan una menor cantidad de proteínas alteradas, considerando que nuestra metodología (DIGE) es más rigurosa en la cuantificación de diferencias significativas en la síntesis de proteínas. La fructosa- bifosfato aldolasa es la única proteína desregulada en los experimentos en simuladores de fuerzas mecánicas realizados por Barjaktarovic *et al.* (2007) que también hemos localizado nosotros. En experimentos anteriores con callos de *Arabidopsis thaliana* en un clinostato 2D, Wang *et al.* (2006) detectaron diferencias en la síntesis de proteínas, como respuesta a las condiciones ambientales de estrés a las que estaba sometido el material biológico.

Algunas de las proteínas identificadas por secuenciación concuerdan con los resultados genómicos (Tabla 18). Las cuatro primeras proteínas de la tabla son candidatos del mismo “spot” alterado en la LDC. La fructosa-bifosfato aldolasa, la GAPC1 y ASP1 se han localizado en un único “spot” en la posición 2g* del Levitador. También hemos identificado otras dos proteínas disminuidas en la posición 2g* de las cuales se observan cambios a nivel génico en la LDC. En algunos casos hay diferencias significativas contradictorias entre la cantidad de proteínas y su expresión, lo que puede deberse a la propia regulación a nivel proteico. Algunas proteínas se regulan por *feedback*, produciéndose una inhibición a nivel génico cuando se alcanza un cierto nivel en la biosíntesis de dicha proteína. En el caso concreto de la proteína GAPC1, alterada en el perfil proteómico, no la hemos encontrado alterada a nivel de expresión, pero sí lo están otras proteínas relacionadas, como GAPA-2 (*AT1G12900*), cuya expresión génica se encuentra aumentada (el listado completo con la expresión cuantitativa de las sondas génicas alteradas en las diferentes condiciones experimentales está disponible como Tabla 1 de material suplementario en soporte electrónico CD).

Tabla 18. Coincidencia entre algunas de las posibles proteínas identificadas por secuenciación con las alteraciones génicas encontradas en el análisis con <i>microarrays</i> . (+) Aumento, (-) Disminución.						
Alteraciones proteicas			Alteraciones genómicas			
Nombre de la proteína	Posición afectada		ID	Nivel de expresión (fold change)		Alteraciones en otras posiciones (fold change)
Fructosa-bifosfato aldolasa	LDC (+)	2g* (-)	AT2G36460	LDC (-)	2g* (-)	--
GAPC1 (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa C, subunidad I)	LDC (+)	2g* (-)	AT3G04120	LDC (-)	2g* (+)	1,9g* (+)
Cinnamil- alcohol deshidrogenasa (CAD)	LDC (-)		AT3G19450	(-)		--
GDH1 (glutamato deshidrogenasa)	LDC (+)		AT5G18170	(+)		0g* (-)
Factor de iniciación traducción eIF-4A	2g* (-)		AT1G51380	(+)		LDC (+)
ASP1 (aspartato-amino transferasa)	2g* (-)		AT2G30970	(+)		
TCTP (proteína antitumoral)	2g* (-)		AT3G16640	(-)		LDC (-)

2.2. Efectos sinérgicos de la modificación simultánea del campo gravitatorio y el campo magnético

Hemos encontrado un efecto sinérgico entre el fuerte campo magnético y las condiciones de gravedad alterada que se puede observar en los resultados de ontología. El efecto de desregulación génica en las posiciones intermedias es más específico para algunos procesos celulares concretos. También hemos observado en los paneles del análisis GEDI que tanto el efecto fuerte del campo magnético como el efecto más sutil de la gravedad efectiva son más potentes en las posiciones intermedias que combinan fuerte campo magnético y variación de gravedad efectiva ($0,1g^*$ y $1,9g^*$) que en las posiciones de alto campo sin variación de gravedad efectiva ($1g^*$) o las posiciones con un menor campo magnético ($0g^*$ o $2g^*$). Efectos similares a nivel transcriptómico se han observado en otros organismos sometidos a ambientes de crecimiento generadores de estrés y en condiciones de gravedad alterada (Herranz *et al.*, 2010).

Por otra parte se observa una mayor interacción entre las condiciones de gravedad alterada y el campo magnético en microgravedad que en hipergravedad. Existe un mayor número de genes en común entre $0g^*$ y $0,1g^*$ que entre $1,9g^*$ y $2g^*$. Los genes coincidentes normalmente codifican proteínas relacionadas con el metabolismo, con situaciones de estrés y con algunos factores de transcripción. En relación con el crecimiento celular, utilizando el parámetro de detección por *Western-blot* de la nucleolina L1, también detectamos una sinergia entre estas condiciones, especialmente entre microgravedad simulada y el campo magnético ($0,1g^*$), en la que se observa una fuerte degradación de la proteína que en posición $1g^*$, en todo el rango de pI. La sinergia producida entre la gravedad alterada y el campo magnético, como el propio campo magnético por sí solo, afectan a la síntesis de nucleolina L1 y a su actividad, causando modificaciones a nivel postraduccionales en el proceso proteolítico de su degradación, así como a los diferentes estados de fosforilación/desfosforilación, que regulan que la proteína esté activa o inactiva (González-Camacho y Medina, 2005; 2006).

3. Alteraciones del Ciclo Celular y de su Regulación Hormonal inducidas por las condiciones de Gravedad Alterada

3.1. Variaciones en la expresión de los genes que controlan el Ciclo Celular

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en los datos de alteración de la expresión génica y proteómica en las muestras expuestas a diferentes condiciones de gravedad alterada hemos elaborado un modelo de interacciones moleculares entre los candidatos a tener un papel más importante en el sistema del control de la proliferación y el crecimiento celular. Anticipamos este esquema en la Figura 94 para facilitar la integración de los datos moleculares que se discutirán durante este apartado. A continuación discutiremos qué elementos de esta red molecular están afectados en cada simulador y cómo se puede integrar esta información en un modelo funcional que explique los efectos de la gravedad alterada sobre el sistema de la proliferación y el crecimiento celular en dos sistemas modelo de células proliferantes en *Arabidopsis*. Ciertamente, esta integración es una tarea difícil y compleja, puesto que la regulación del ciclo celular es el resultado de la interacción de un gran número de factores, muchos de los cuales actúan a diferentes niveles y en diferentes etapas, de modo que es muy arriesgado atribuir un efecto unívoco al hallazgo de la alteración de la expresión de un determinado gen bajo unas ciertas condiciones. Además, la regulación no se produce sólo a nivel transcriptómico, sino que los efectos de un determinado factor dependen frecuentemente de alteraciones postraduccionales (el estudio proteómico aporta datos importantes en este sentido). Teniendo en cuenta todo esto, intentaremos ofrecer una aproximación inicial a la identificación de las alteraciones inducidas en la regulación del ciclo celular por cambios en la gravedad ambiental. Es muy importante tener en cuenta que este es un trabajo pionero, del que no existen precedentes bibliográficos directos.

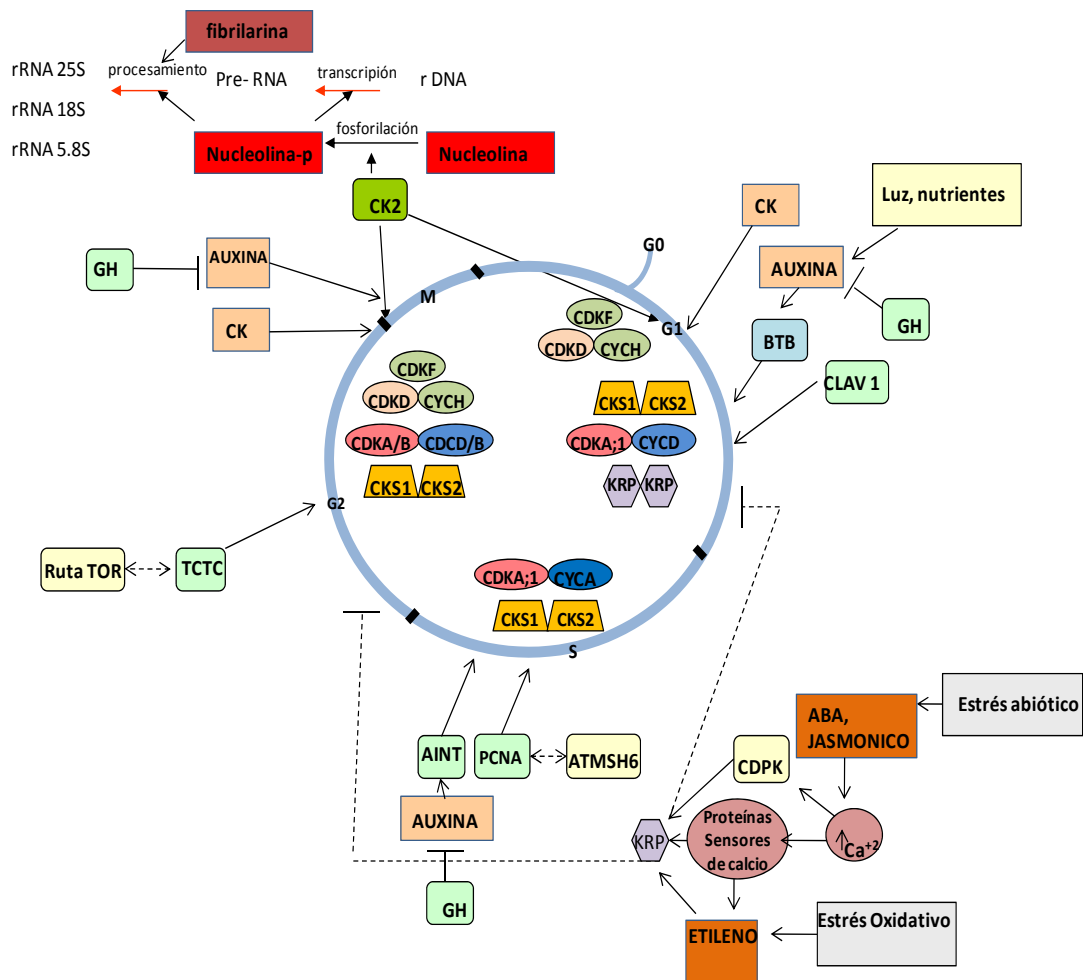


Figura 94. Representación gráfica de las principales proteínas y reguladores del ciclo celular (reguladores, fitohormonas, estreses, condiciones ambientales) descritos en *Arabidopsis thaliana*. Se representan las diferentes etapas del ciclo celular con las proteínas claves en la regulación del ciclo y los factores o reguladores que les afectan. En la parte central se representan las proteínas del ciclo celular y por fuera otros reguladores o factores implicados en dicha regulación, como son reguladores de proliferación y crecimiento celular (verde), y proteínas relacionadas (amarillo o azul), al igual que las respuestas a estrés que desencadenan la activación de una cascada de proteínas para la inhibición del ciclo.

3.1.1. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en muestras sometidas a hipergravedad en la Centrifuga de Gran Diámetro (LDC)

Las muestras crecidas en un ambiente con el doble de gravedad del terrestre presentan alteraciones en genes relacionados con todas las etapas del ciclo celular.

Nos parece especialmente relevante, por su carácter general, con repercusión en diferentes etapas del ciclo, la desregulación observada en dos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (genéricamente denominados ICKs ó CKIs). Los ICKs más

importantes pertenecen a la familia de las KRPs (*Kip-related Proteins*) y los genes concretos que aparecen desregulados son *KRP3* y *KRP6* (Menges *et al.*, 2005; Van Leene *et al.*, 2010). La desregulación afecta a estos dos genes de forma opuesta (aumento de *KRP3* y disminución de *KRP6*). Pruebas *in vivo* demuestran que la sobreexpresión de KRPs, que se unen a ciclinas tipo D y tipo A, inhibe la progresión del ciclo celular (Coelho *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2002; Schnittger *et al.*, 2003). Las proteínas ICK/KRP, cuando se encuentran en estado desfosforilado suprimen la actividad de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) bloqueando la transición G2/M. La fosforilación de ICKs/KRPs las inactiva, permitiendo la entrada en mitosis. Este mecanismo se ha propuesto como la clave de la regulación de la transición G2/M (Dissmeyer *et al.*, 2009). Los genes *ICK/KRP* pueden ser inducidos por ácido abscísico (ABA), en el marco de la respuesta de la planta ante situaciones de estrés (Wang *et al.*, 1998), para impedir que las células entren en mitosis en condiciones ambientales desfavorables. Consiguientemente, un aumento de expresión de los inhibidores de quinasas provoca un fenotipo de células más largas (Wang *et al.*, 2000).

Específicamente respecto a la fase S, hemos observado en la Centrífuga el aumento en la expresión génica de una de las seis subunidades que forman el complejo ORC (“*Origin Recognition Complex*”). Este es uno de los complejos descritos como estimuladores de la entrada en fase S de células de hoja diferenciadas en respuesta a la sobreproducción de los factores de transcripción tipo E2F/DPa (De Veylder *et al.*, 2002). En todos los casos se trata de proteínas que se ensamblan en la cromatina facilitando el inicio de replicación, permitiendo la unión de otros componentes requeridos para la maquinaria de replicación, como la DNA polimerasa. Su compleja regulación transcripcional está bien caracterizada en *A. thaliana* (Francis, 2007). También hemos observado un aumento de *MCM7*, que participa en la replicación de células somáticas y en endoreduplicación (Francis, 2007), y de *CDC45*, que se relaciona con los orígenes de replicación en levaduras (Yabuuchi *et al.*, 2006). Sin embargo, observamos disminución en la expresión de los genes correspondientes a algunas isoformas de histonas específicas de fase S que son requeridas para la replicación del DNA (Tabla 1 de material suplementario en soporte electrónico (CD); Chaubet *et al.*, 1996; Reichheld *et al.*, 1996; Taoka *et al.*, 1999).

En cuanto a la transición G2/M, hemos encontrado varios genes desregulados con función conocida en este punto del ciclo, como los correspondientes a ciertas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas, claves para la progresión del ciclo celular y la entrada en mitosis. Encontramos un aumento de *CDKB1;1* y *CDKB1;2*, quinasas dependientes de ciclinas específicas de plantas, elementos fundamentales en el control de la entrada en mitosis (Boudolf *et al.*, 2001). La CDKB1 es una CDK muy especial para nuestro estudio, ya que se ha propuesto su interacción con la CDKA en el proceso de activación y desactivación de esta última dentro del *checkpoint* G2/M. En animales y levaduras esta función la lleva a cabo la CDC25, pero existen serias dudas de que esta proteína tenga un verdadero homólogo en plantas, ya que las supuestas proteínas homólogas no presentan todas las características requeridas (Boudolf *et al.*, 2006; Dissmeyer *et al.*, 2009). CDKB1 se ha propuesto como un posible sustituto en plantas de CDC25 (Boudolf *et al.*, 2006) y, en todo caso, se ha demostrado su intervención en la fosforilación inactivante de ICK2/KRP2 que libera la inhibición de esta proteína sobre CDKA, induciendo la entrada en mitosis (Boudolf *et al.*, 2006; Dissmeyer *et al.*, 2009). Contrariamente, una reducción de *CDKB1* bloquea la transición G2/M generando un incremento en el ratio 4C/2C (Porceddu *et al.*, 2001). Resultados similares se han encontrado en *Chlamydomonas reinhardtii* (Bisova *et al.*, 2005). Se ha observado que *CDKB1;1* puede inducirse por estrés biótico y abiótico (Zhiponova *et al.*, 2006), aunque no se aporta información sobre los mecanismos de la inducción.

También hemos observado un aumento de expresión de genes de ciclinas relacionadas con esta transición G2/M, como son las *CYCB1;1*, *CYCB1;3* y *CYCB1;4*, en condiciones de hipergravedad. Como se ha mencionado en otros apartados de esta Memoria, la ciclina B1 se expresa y se acumula durante la fase G2 del ciclo celular y es degradada durante la mitosis (Criqui *et al.*, 2000). Por otra parte, observamos un aumento de expresión de la proteína de unión a CDK, CKS2, proteína adaptadora (Van Leene *et al.*, 2010) que alcanza su mayor expresión en etapas tempranas a la mitosis (Menges *et al.*, 2005).

Finalmente, hemos encontrado un aumento de la expresión del gen de la DNA topoisomerasa II en los cultivos *in vitro* sometidos al doble de la gravedad control. Estudios genéticos y bioquímicos en levaduras y en células animales relacionan la DNA

topoisomerasa II con la condensación de la cromatina durante la mitosis (Cuvier y Hirano, 2003; Uemura *et al.*, 1987). En relación con este dato, tanto las plantas como los animales poseen una topoisomerasa II dependiente del *checkpoint* de la fase G2. La sobreexpresión de *CYCB2* en células de plantas (Gimenez-Abian *et al.*, 2002) o la sobreexpresión de *CYCB1* en células humanas (Deming *et al.*, 2001) induce la topoisomerasa II eludiendo este *checkpoint*.

En conjunto, todas estas alteraciones observadas indican una aceleración del ciclo celular y una estimulación de la entrada en mitosis.

Además, estos datos obtenidos sobre genes directamente implicados en el control del ciclo son coherentes con otros que afectan a genes que participan indirectamente en dicho control y que se alteran en condiciones de hipergravedad (LDC) en el mismo sentido de estimular el progreso del ciclo y la proliferación celular. Entre estos genes se encuentran los siguientes:

- *Clavata1 (CLAV1)*. Aparece disminuido, lo que promueve la división celular al dejar de inhibir a la proteína WUS (Schoof *et al.*, 2000).
- *AINT5*. Pertenece a una familia génica implicada en regular la coordinación entre la proliferación y el crecimiento celular, controlando la expresión de la ciclina D (Mizukami y Fischer, 2000; Dewitte y Murray, 2003). Aparece disminuido en su expresión.
- *Armadillo BTB*. Es un regulador en la progresión del ciclo en hojas, que integra las señales de desarrollo de la planta con la replicación DNA y con los reguladores de la transcripción (Masuda *et al.*, 2008). Su expresión aparece aumentada.

El crecimiento celular requiere un incremento en la tasa del metabolismo, mediante un aumento en la síntesis de ribosomas y hemos encontrado una inducción en la expresión de algunas proteínas ribosómicas y de otros componentes implicados en la síntesis de proteínas, como es el caso de subunidades de la RNA polimerasa II (Conlon y Raff, 1999). Hemos encontrado por PCRq un aumento en la expresión del gen de una proteína implicada en el procesamiento del pre-rRNA, como es el caso de *AtFIB1* (Cerdido y Medina, 1995) aunque no encontramos alteraciones en los niveles de

expresión de *AtNUC-L1* por PCRq. Sin embargo, los resultados en los niveles de AtNuc-L1, por *Western-blot*, demuestran que existen diferencias en el patrón de fosforilación aumentando la degradación proteica. Se ha establecido una clara relación entre la fosforilación y la degradación proteolítica de la nucleolina con un aumento de la actividad nucleolar en proliferación celular (González-Camacho y Medina, 2005; 2006; Medina *et al.*, 2010).

Resumiendo, en condiciones de hipergravedad existen alteraciones génicas en las distintas etapas del ciclo celular, pero en cambio los resultados de citometría de flujo no revelan alteraciones importantes en la duración de las fases del ciclo. Esto puede ser debido a la duración del tratamiento de gravedad alterada, muy inferior a la duración del ciclo celular, suficiente para la detección de alteraciones genómicas, pero insuficiente para visualizar su manifestación en un patrón alterado de las fases del ciclo. Alternativa o complementariamente, el nivel de hipergravedad experimentado (2g) puede encontrarse por debajo del umbral requerido para provocar cambios detectables en las fases del ciclo.

3.1.2. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en muestras sometidas a microgravedad simulada en la Random Positioning Machine (RPM)

Las muestras sometidas a microgravedad simulada por fuerzas físicas en la RPM no presentan alteraciones significativas en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular mediante la técnica de *microarrays*. Sin embargo, mediante PCRq encontramos una leve aunque significativa disminución de expresión en el gen de la ciclina B1. Teniendo en cuenta que este gen posee su máxima expresión en la fase G2 (empieza a expresarse desde la fase S y su expresión se prolonga hasta la destrucción de la proteína por ubiquitinación en anafase mitótica, Inze y De Veylder, 2006) una menor expresión a nivel poblacional indicaría que no se han llegado a alcanzar los niveles máximos de expresión o que se acorta la fase G2, en la que la célula debe crecer hasta alcanzar el tamaño crítico que permite su división. Diferentes estudios en *Arabidopsis* relacionados con el ciclo celular demuestran que la parada del ciclo en fase G2 provoca un aumento considerable de expresión de esta ciclina (Menges *et al.*, 2005; Suzuki *et*

al., 2005; Visanji *et al.*, 2006). La no degradación de la ciclina B1 en tabaco provoca un retraso en la progresión del ciclo celular y como consecuencia se producen células más largas (Weingartner *et al.*, 2004).

Por otra parte, los resultados de citometría de flujo muestran la alteración del ciclo celular en una población celular asincrónica (aumento del porcentaje de células en fase S ó S/G2 y disminución en G1), lo cual es coherente con un aumento en la tasa de proliferación celular, suponiendo que se mantiene la duración relativa de cada fase en microgravedad y en gravedad control, es decir, que la fase G1 (que disminuye en microgravedad) es la más larga en cualesquiera de las dos condiciones de gravedad.

Por lo tanto, una disminución a nivel poblacional en la expresión de la ciclina B1 junto con un aumento en la tasa de proliferación, nos llevaría a pensar en una disminución de la duración de la fase G2. El acortamiento de esta fase explicaría la disminución del tamaño de las células meristemáticas de la raíz encontrada en estas condiciones de crecimiento, tanto en nuestros experimentos en el Levitador magnético, como en estudios anteriores. Este resultado probablemente se debe a una disminución en la síntesis de proteínas, coherente también con una menor cantidad de nucleolina L1 existente en el nucleolo en células del meristemo radicular (Matía *et al.*, 2007). En otros experimentos de nuestro grupo, realizados sobre plántulas de *Lepidium sativum*, crecidas en condiciones de microgravedad simulada en un clinostato, se observó una disminución similar en la cantidad de fibrilarina y en una proteína homóloga a la nucleolina, NopA64, en el componente fibrilar denso del nucleolo de células meristemáticas (Sobol *et al.*, 2006).

Es importante destacar que los resultados previos que concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo y nuestros propios resultados obtenidos con técnicas morfométricas se han alcanzado utilizando plántulas sometidas a un tratamiento de microgravedad desde el momento de la hidratación de las semillas, mientras que los resultados genómicos y de citometría de flujo que se presentan aquí se deben a un tratamiento de unas horas sobre células en cultivo *in vitro*. Tanto la duración del tratamiento como la existencia o no de mecanismos específicos de detección de la gravedad en uno y otros sistemas experimentales, son factores a tener en cuenta a la hora de valorar el significado biológico de estos resultados.

Por el contrario, un dato discrepante obtenido en el cultivo celular, respecto del obtenido en el meristemo, es el aumento de expresión de los genes de las proteínas relacionadas con el procesamiento del pre-rRNA, como *AtNUC-L1* y *AtFIB1* que resulta de los experimentos de PCRq. Sin embargo, por *Western-blot* de *AtNUC-L1* detectamos una disminución en los estados de fosforilación de la proteína (menor rango en el pI) y una menor proteólisis, indicativas en ambos casos de una disminución en la actividad de esta proteína (González-Camacho y Medina, 2005; 2006; Medina *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que aunque existe un aumento de expresión en estas ribonucleoproteínas, existe una disminución en su actividad. Esta interpretación es coherente con el acortamiento de la fase de crecimiento G2, en la que la nucleolina acumulada se activa mediante la movilización de la forma insoluble a soluble y la desfosforilada a la fosforilada (González-Camacho y Medina, 2006). En este sentido, es conveniente recordar que la expresión de un gen no significa necesariamente la actividad de la proteína que codifica. En el caso concreto del nucleolo, la mayor producción de pre-rRNA precursor y de determinados factores reguladores no significa necesariamente una mayor tasa de producción del producto final, los ribosomas, como fue clásicamente enunciado por Goessens (1976), afirmando que la forma, el tamaño y la morfología del nucleolo, como expresión de la síntesis de ribosomas, son el resultado del balance entre la tasa de producción de los precursores ribosómicos y la demanda efectiva de ribosomas desde el citoplasma. En mutantes deficientes en *AtNUC-L1* se demostró que una deficiencia grave en el procesamiento del pre-rRNA produce finalmente un aumento de la tasa de expresión de los genes ribosómicos, debido a la demanda por parte del citoplasma, al que llegan ribosomas defectuosos y/o en cantidades insuficientes (Pontvianne *et al.*, 2010).

3.1.3. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en muestras sometidas a distintas condiciones de gravedad alterada en el Levitador magnético

Las muestras sometidas a la influencia de un campo magnético entre 10 y 16 Tesla (1g*) sufren alteraciones en la expresión génica que pueden relacionarse con una respuesta a estrés. Además, observamos alteraciones en la progresión del ciclo celular en esta posición del Levitador, aunque no encontramos alteraciones significativas en los

genes que regulan el ciclo celular, ni genes relacionados. Tan sólo observamos disminución en la expresión del gen de la proteína ARGONAUTA, cuya función está relacionada con el desarrollo y la diferenciación celular (Menges *et al.*, 2002). Esta desregulación se debería principalmente al efecto del campo magnético. Experimentos de levitación diamagnética en *Saccharomyces cerevisiae* en las que algunos promotores relacionados con respuesta ante fuerzas físicas han sido delecionados, dieron como resultado alteraciones en el tamaño celular y en el ciclo celular. El aumento de la duración de la fase S y la disminución de las fases G1 y G2/M, se acompañó de cambios en la expresión génica (Coleman *et al.*, 2007).

En el caso de microgravedad simulada ($0g^*$), se aprecia con claridad un efecto sinérgico entre las alteraciones debidas a la ausencia de gravedad y a las debidas al elevado campo magnético. Ambos cambios provocan un aumento en la proliferación celular, que se observa reforzado cuando ambos factores ambientales están simultáneamente presentes.

Así pues, en la posición $0g^*$ del Levitador obtenemos alteraciones génicas en las ciclinas tipo B, expresadas principalmente durante la fase G2, cuyos genes muestran disminuida su expresión. Estos resultados corroboran nuestras interpretaciones, expuestas en apartados anteriores, sobre la disminución en la duración de las fases de crecimiento y más concretamente en el caso de la fase G2, lo que ocasionaría una mayor proliferación celular y células más pequeñas.

Otro elemento que corrobora nuestros razonamientos es la disminución de expresión del gen de la proteína de unión a CDKs, *CKS1* (correspondiente a una proteína de acoplamiento a CDKs; De Veylder *et al.*, 2001). Un aumento en la síntesis de esta proteína en *Arabidopsis* causa un incremento en la duración del ciclo celular, al igual que sucede en animales y en levaduras, aunque el mecanismo se desconoce (Dunphy y Newport, 1989; Hayles *et al.*, 1986; Hindley *et al.*, 1987). Se ha descrito la asociación de proteínas *SUC1/CKS1* con el complejo promotor de anafase, con el proteosoma y con proteínas reguladoras del ciclo tales como CDC25 (Kaiser *et al.*, 1999; Patra *et al.*, 1999). Es posible que este complejo se una a CDKs en condiciones no normales e interfieran en la activación de dichas quinasas dependientes de ciclina. El aumento de CKS1 produce un alargamiento de las fases G1 y G2, por inhibición de las

transiciones G1/S y G2/M, causando una prolongación del ciclo celular y reduciendo el tamaño de la zona meristemática y de la zona de elongación. Se produce una disminución en la tasa de división celular, dando lugar a células más largas en el cilindro cortical. Por tanto, una disminución de expresión en este gen podría producir el efecto contrario, lo que podría provocar un aumento de proliferación celular, en concordancia con nuestros resultados. Existe también, una clara relación entre el control de la duración del ciclo celular y el tamaño de la zona meristemática, siendo importante en la tasa de crecimiento del órgano. La implicación del tamaño del meristemo en el crecimiento de los órganos ya ha sido observada en plantas que crecen en condiciones de estrés (Beemster y Baskin, 1998).

En estas condiciones de crecimiento encontramos disminuida la expresión del gen *Siamase* (*SIM*), gen relacionado con la endoreduplicación y con la supresión de mitosis (Francis, 2007). La proteína SIM se encuentra relacionada estructuralmente con inhibidores de CDKs (ICKs) e interacciona con CDKs tipo A y D. Un aumento de expresión del gen *SIM* crea una fuerte inhibición de la división celular (Churchman *et al.*, 2006). Se ha observado una clara relación entre la expresión de *SIM* y el de la ciclina B1;2, los cuales podrían regular el balance entre la división celular y la endoreduplicación (Walker *et al.*, 2000). Schnittger *et al.*, (2002) observaron que en tricomas endoreduplicados, la expresión ectópica de *CYCB1;2* induce la división celular y consiguientemente limita el contenido de DNA de la célula. Ambos genes aparecen desregulados en la posición 0g*. Esta condición de estrés parece que provoca un aumento de proliferación celular, lo que conllevaría por otro lado lógicamente a una disminución de expresión de *SIM*. Sin embargo, la disminución de expresión de la ciclina B1;2 no va en relación con un aumento de proliferación celular, como hemos estado viendo también en otros experimentos hasta el momento. Esta controversia es discutida en otro apartado de este trabajo.

En condiciones de hipergravedad simulada (2g*) también observamos alteraciones en algunos genes relacionados con el ciclo celular. Observamos una disminución en la expresión del gen de la proteína reguladora CKS1, lo que sugiere una disminución de la duración de las etapas de crecimiento, ya que (De Veylder *et al.*, 2001) han demostrado que un aumento de CKS1 produce un alargamiento de las fases

G1 y G2, por inhibición de las transiciones G1/S y G2/M, causando una prolongación del ciclo celular. Posiblemente la desregulación de este gen puede estar relacionada con el efecto conjunto del campo magnético y la gravedad alterada, ya que se han encontrado las mismas alteraciones en la posición $0g^*$ del Levitador y no en los simuladores de fuerza mecánica.

En cuanto a la expresión de genes indirectamente relacionados con la regulación del crecimiento y la división celular, merecen mención las siguientes alteraciones encontradas en las diferentes condiciones del Levitador:

- *AtMSH6*. Corresponde a una proteína relacionada con el factor PCNA, implicado en proliferación celular y en la reparación del DNA (Guo *et al.*, 2004; Umar *et al.*, 1996). Aparece disminuido en micro- e hiper- gravedad simulada,
- *Aintegumenta (AINT6)*. Las proteínas de la familia AINT regulan la coordinación entre la proliferación y el crecimiento celular, es decir la competencia meristemática (Mizukami y Fischer, 2000). La función prolongada de AINT mantiene elevada la tasa de proliferación celular durante un periodo más largo de tiempo (Mizukami y Fischer, 2000; Mizukami, 2001). Muestra expresión disminuida en microgravedad simulada. Este resultado es aparentemente contradictorio con el incremento de proliferación celular observado en estas condiciones, pero no tanto si tenemos en cuenta que otros factores asociados a la proliferación, como la ciclina B1, también aparecen disminuidos.
- *Root meristemless (MLS)*. Es un gen relacionado con el desarrollo del meristemo apical. Los mutantes *mls* producen embriones con raíces muy cortas, con un número limitado de divisiones celulares (Dudits *et al.*, 2011). Su expresión aumenta en las posiciones $0g^*$ y $2g^*$ del Levitador.

No encontramos alteraciones en el tamaño nucleolar, ni otras alteraciones significativas que afecten ni al crecimiento ni al desarrollo de los callos vegetales. En el experimento con *microarrays* hemos encontrado sólo algún gen reprimido relacionado con proteínas ribosómicas en la posición $0,1g^*$ y no hay alteraciones en las proteínas que hemos estudiado preferentemente en este trabajo, con una notable excepción: en el caso del campo magnético ($1g^*$), detectamos, sorprendentemente, una fuerte inducción

de *AtNUC-L1* por PCRq, en un contexto en el que la expresión de este gen no aparece significativamente alterada en otras posiciones del Levitador. Por el contrario, los estudios mediante *Western-blot* realizados sobre esta proteína nos indican que el nivel detectable de proteína está disminuido. Ciertamente, es difícil interpretar estos resultados. La existencia de alteraciones en la traducción de la nucleolina L1 podría ser la causa de una mayor activación en la tasa de transcripción, como consecuencia de la disminución en la cantidad de proteína sintetizada (Goessens, 1976). Habría que tener en cuenta, además, que los niveles de síntesis de esta proteína están estrechamente relacionados con el procesamiento del pre-RNA, y por consiguiente con el crecimiento y la progresión del ciclo celular (Kojima *et al.*, 2007; Petricka y Nelson, 2007; Pontvianne *et al.*, 2007). Sin embargo, en las posiciones de micro- e hiper- gravedad no observamos fuertes alteraciones en la cantidad de proteína, ni tampoco en el patrón electroforético de su degradación proteolítica, según los resultados del *Western blotting*, lo cual es coherente con los resultados de expresión génica.

Resumiendo, los efectos del Levitador magnético en condiciones de gravedad alterada son más difíciles de observar que los observados en simuladores mecánicos, debido a la fuerte influencia que ejerce el propio campo magnético sobre la proliferación y el crecimiento celular. Esta influencia es constante para todas las posiciones del Levitador, por tanto tiende a homogeneizar los efectos observados, independientemente del nivel de g^* al que están sometidas las muestras.

3.2. Variación de la expresión génica de genes claves de fitohormonas implicadas en la división y en el crecimiento celular

La funcionalidad del meristemo radicular y, en particular, la regulación de la proliferación y el crecimiento de estas células, está fuertemente influenciada por diferentes fitohormonas que desempeñan papeles antagónicos, de modo que el resultado final depende de la resultante de la acción combinada de todas ellas (Figura 95).

Así, las auxinas favorecen la división celular y estimulan la competencia meristemática, mientras que las citoquininas promueven la diferenciación y provocan el acortamiento del meristemo (Dello Ioio, 2007). Ambas fitohormonas, a su vez, tienen efectos contrarios sobre la expresión de giberelinas, cuyo efecto es estimular el alargamiento de la raíz.

Finalmente, el ácido abscísico y el etileno son hormonas asociadas con el estrés, en cuya respuesta inhiben los procesos asociados al crecimiento y la proliferación.

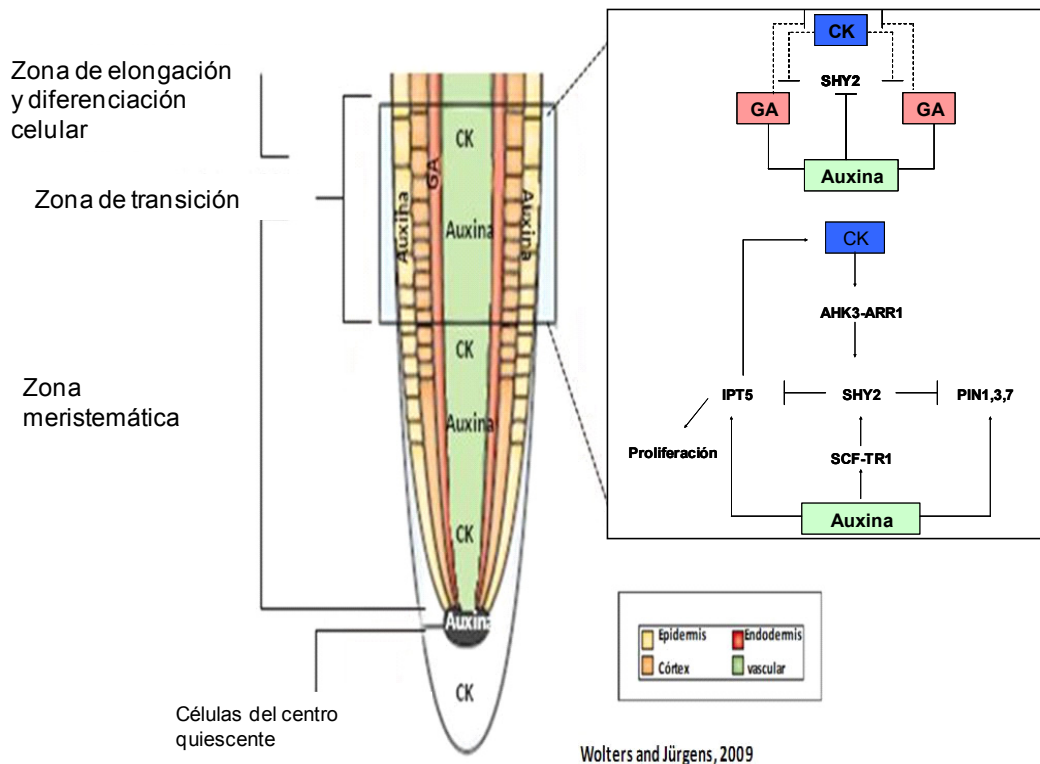


Figura 95. Modelo del efecto de las fitohormonas en el crecimiento de la raíz. Se resaltan las diferentes capas celulares del meristemo apical y se adjunta un esquema de las relaciones positivas o negativas entre las diferentes hormonas en la zona de transición.

3.2.1. Alteraciones en genes implicados en la vía de respuesta a ácido abscísico (ABA) y su influencia en la división y crecimiento celular

El ácido abscísico (ABA) regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la maduración de las semillas y la dormancia, así como la regulación del desarrollo en condiciones adversas (Giraudat *et al.*, 1994).

Las mutaciones en los genes que codifican para proteínas implicadas en la vía de transducción de señales del ABA, como *ABI1-1* y *ABI2-1*, producen una falta de adaptación a condiciones adversas acompañada de una regulación anormal y defectos en algunos de los procesos que regula dicha hormona. Estas mutaciones ocasionan modificaciones en la raíz (Vartanian *et al.*, 1994), y reducen la maduración y la dormancia en las semillas por falta de sensibilidad al ABA (Finkelstein y Somerville, 1990; Gosti *et al.*, 1995). En nuestro caso registramos un aumento en la expresión del gen *ABI2* en condiciones de micro- e hiper-gravedad simulada en el Levitador magnético, producido posiblemente por la situación de estrés ambiental a la que están sometidas la plántulas, principalmente en las condiciones en las que existe un efecto combinado de gravedad alterada y elevado campo magnético. Por otra parte, los genes *ABI* actúan inhibiendo la vía de transducción de las MAPKs (MAP quinasas; Rodríguez, 1998), una de las cuales (*ATMKK6*) también tiene afectada su expresión en nuestros experimentos, en la condición 0g*.

El ABA regula el crecimiento de la planta y el desarrollo respondiendo a factores de estrés (Cutler *et al.*, 2010), concretamente modificando las cantidades de calcio libre en el citosol, que funciona como señal intracelular para controlar diferentes procesos celulares, incluidos la división celular, numerosas rutas metabólicas y la expresión génica (Tuteja y Mahajan, 2007). Muchas proteínas actúan como sensores de calcio, como las calmodulinas, calcineurinas tipo B, fosfolipasas D, anexinas, calreticulinas (Kudla *et al.*, 2010) y las CDPKs (*calcium dependent protein kinase*; Cheng *et al.*, 2002; Pettko-Szandtner *et al.*, 2006) Se han encontrado alteraciones en algunas de estas proteínas en los resultados del *microarray* en la mayoría de las condiciones experimentales y también en procesos celulares que están regulados por el flujo de iones (Tabla 1 de material suplementario en soporte electrónico (CD)). Esto

sugiere que la alteración de la gravedad es considerada por la planta como un tipo de estrés abiótico, frente al cual desencadena los mecanismos de defensa a su alcance.

3.2.2. Alteraciones en genes implicados en la vía de respuesta a brasinoesteroides, giberelinas, ácido jasmónico y etileno y su influencia en la división y crecimiento celular

Se han encontrado algunas alteraciones en genes relacionados con la vía de transducción de señales de algunas fitohormonas típicamente relacionadas con la respuesta a condiciones de estrés, como los brasinoesteroides, las giberelinas, el ácido jasmónico y el etileno.

El gen *EIN3*, relacionado con la vía de respuesta a etileno y de brasinoesteroides y el gen *PIF4*, implicado en la ruta de las giberelinas, se encuentran ambos reprimidos en muestras sometidas al doble de gravedad terrestre, en la Centrífuga.

La expresión de *COL1* se ve favorecida en la posición intermedia del Levitador, 0,1g*. *COL1* es un inhibidor del crecimiento celular inducible por ácido jasmónico (JA), y detiene el ciclo celular en la fase G2. Se sintetiza ante situaciones de estrés o como mecanismo de defensa frente a herbicidas y patógenos. Cuando se produce un aumento de JA, se induce *COL1*, activándose genes de defensa y resistencia, promoviendo la síntesis de aminoácidos y del metabolismo secundario e inhibiendo genes de senescencia (Devoto *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2003). Algunos de estos procesos biológicos se han detectado también alterados en el análisis de GO, especialmente en las muestras sometidas a ambientes que maximizaban el cambio gravitatorio y el cambio en el campo magnético.

3.2.3. Alteraciones en genes implicados en la vía de respuesta a auxinas y su influencia en la división y crecimiento celular

Muchos genes reguladores del ciclo celular son inducidos por auxinas, principalmente los que controlan la fase S y la transición G2/M (Teale *et al.*, 2006). El efecto y transporte de las auxinas se conoce desde hace décadas e incluso fue muy

tempranamente documentado cuando Charles y Francis Darwin publicaron “*The power of movement in Plant*”. Por otra parte, también se sabe que los cambios en la distribución de auxinas están relacionados con la concentración de éstas y su asociación con las condiciones ambientales del desarrollo, tales como la respuesta a la gravedad, a la luz solar, etc... (Friml *et al.*, 2002; 2003).

Nuestros resultados con plántulas transgénicas DR5:GUS nos muestran que el campo magnético y la condición de microgravedad simulada producen una acumulación de auxinas en la punta de la raíz que se extiende a las capas laterales de la columela, así como a las células corticales, adoptando el mismo patrón de tinción que el observado cuando se añade al medio un inhibidor del transporte polar de auxinas (Casimiro *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2006).

Las consecuencias de la acumulación de auxinas en la punta de la raíz como resultado de la inhibición, total o parcial, del transporte polar de auxinas se han estudiado mediante el uso de inhibidores químicos o de mutantes en genes implicados en dicho transporte. Así, se ha observado que uno de estos inhibidores, el ácido N-1-naftiltalámico (NPA), además de modificar el patrón de tinción GUS en las plántulas DR5:GUS de la forma mencionada más arriba, produce cambios en la duración del ciclo celular en las células meristemáticas de la raíz (Rubery, 1990).

Algunos mutantes en el transporte de auxinas, como el mutante *eir1-1* (o *pin2*), que afecta a una proteína responsable del eflujo de auxinas, producen una acumulación ectópica de DR5:GUS en la zona lateral de las células de la columela, similar a la que hemos encontrado en nuestras condiciones experimentales, no observándose cambios en la función desempeñada por dichas células. Esto provoca una curvatura en el crecimiento de la raíz debida a la acumulación de auxinas en las células de uno de los laterales del meristemo radicular (Sabatini *et al.*, 1999). Además está descrito que el mutante *eir1* provoca un aumento endógeno de la concentración de auxinas en la punta de la raíz e incrementa la formación de raíces laterales. Se observan defectos en el transporte basipétalo, dando lugar a un fenotipo agravitrópico, donde no se produce de manera satisfactoria el eflujo desde la punta de la raíz hacia la zona de elongación; como consecuencia, en estas zonas se suprime la respuesta al aumento de auxinas (Luschnig *et al.*, 1998). La mayoría de las células de la raíz donde existe una

acumulación de auxinas no presentan diferenciación celular, en coherencia con el hecho de que la diferenciación supone la pérdida de la competencia meristemática la cual es mantenida, precisamente, por altos niveles de auxinas (Sabatini *et al.*, 1999). Este fenotipo del mutante *eril* es muy similar al que encontramos en nuestras condiciones ambientales de gravedad alterada en el caso del campo magnético (en las distintas posiciones) o de microgravedad simulada (RPM). Se pierda (RPM) o no se pierda el gravitropismo (ausencia de levitación de los gránulos de almidón), encontramos una mayor acumulación de auxina que afecta a la zona cortical donde se produce un aumento de proliferación celular.

A la vista de estos resultados podemos concluir que el aumento de proliferación celular observado en el meristemo radicular en nuestros experimentos en microgravedad simulada y también en experimentos anteriores de nuestro laboratorio, en microgravedad real o simulada, es debido a una mayor concentración de auxinas en las capas del cilindro cortical del meristemo radicular. Esta alta concentración local de auxinas induce la estimulación de genes implicados en la regulación del ciclo celular, con el efecto fenotípico que se ha descrito.

Otros autores han realizado experimentos que corroboran la acumulación de auxinas que nosotros hemos detectado. En estos experimentos se han empleado plantas transgénicas transformadas con el gen *IAAH*, que promueve los niveles de auxina en presencia del sustrato específico IAM, (indol-3-acetamida) crecidas en condiciones de microgravedad simulada, en las que se observó que la microgravedad promovía la actividad de las auxinas independientemente de la presencia de IAM (Shimazu *et al.*, 2003). En otros experimentos en microgravedad, real o simulada, en plantas, se ha observado también una inhibición en el transporte polar de auxinas (Oka *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1999) junto con la pérdida de la respuesta gravitrópica de la planta (Muday y Haworth, 1994).

Por otra parte, en los experimentos de *microarrays* realizados sobre cultivos celulares hemos encontrado alteraciones en otros genes relacionados con las auxinas. Si bien los callos no están expuestos al transporte de auxinas, sino que crecen en un medio suplementado con hormonas de crecimiento, la presencia necesaria de estas hormonas (auxinas) en el medio de cultivo indica que su control sobre las funciones de las células,

específicamente sobre la proliferación, que ejercen en las plantas completas, está también presente en el cultivo *in vitro*. Así pues, los cambios encontrados en los callos podrían extrapolarse a la plántula completa, relacionándose con alteraciones en el transporte de estas hormonas que tienen consecuencias sobre el crecimiento y la proliferación celular.

En concreto, en el *microarray* sobre el cultivo celular se ha encontrado reprimido el gen *ARF4* en condiciones de hipergravedad simulada ($2g^*$) en el Levitador magnético. Las proteínas ARF intervienen en la regulación de la expresión de los genes *PIN* (responsables del eflujo de auxinas; Geldner *et al.*, 2003). Además, los ARFs son reguladores positivos de la transcripción de genes de respuesta a auxinas. La disminución de la expresión de *ARF4* podría causar alguna alteración en la regulación y transducción de señales de auxinas, al igual que la disminución en la expresión del gen de la proteína PINOID en condiciones $2g$ (Centrífuga), causando posibles alteraciones en la localización de la proteína PIN (Friml *et al.*, 2004).

También hemos encontrado una represión en la expresión del gen *AXR3* en ambas condiciones de hipergravedad simulada en el Levitador magnético correspondientes a distintas intensidades del campo ($1,9g^*$ y $2g^*$). Puesto que la proteína AXR3 es una molécula represora de respuesta a auxinas, la disminución de su producción provoca una mayor sensibilidad a esta hormona, es decir, el aumento de la transcripción de los genes mediados por auxinas. De hecho, la mutación del gen *AXR3* produce una proteína que no es degradada en presencia de auxinas e interacciona con ARFs, impidiendo la transcripción de genes con respuesta a auxinas. Esto produce una disminución de expresión en DR5:GUS, correlacionada con la ausencia de división celular en las células iniciales de la columela y la no aparición de estatolitos en estas células. Estos resultados indican que la concentración de auxinas encontrada en la parte distal de la raíz, es necesaria para la correcta diferenciación celular (Sabatini *et al.*, 1999).

También observamos que existe un aumento de expresión de *GH3,5/WES1*, (“*indole-3-acetic acid amido synthetase*”), en condiciones de micro- e hiper-gravedad simulada en el interior del Levitador magnético, y un aumento de *GH3,3* en la Centrífuga. Las proteínas GH3/WES1 son componentes esenciales del complejo que

regula a las auxinas en condiciones de estrés biótico o abiótico, en *Arabidopsis*, por lo que la célula activa estas señales de estrés en las condiciones ambientales de hipergravedad. La auxina endógena está regulada en parte por un *feedback* controlado por el grupo de genes *GH3* relacionados con la conjugación de auxina libre. Existe una íntima relación entre el estrés y el aumento de expresión de estos genes que dan lugar a la conjugación de la auxina libre en el medio, lo que implica una disminución del crecimiento (Park *et al.*, 2007).

Por último, hemos encontrado aumento de expresión del gen del transportador *MDR4* en la condición 0g* de microgravedad simulada en el Levitador magnético. Las proteínas transportadoras MDR (“*Multidrug resistance protein*”) en *Arabidopsis* intervienen en el transporte polar de auxinas. En concreto, el gen *MDR4* se expresa en las células de la capa exterior de la raíz, incluyendo la epidermis (Birnbaum *et al.*, 2003; Terasaka *et al.*, 2005), y codifica para un transportador de eflujo basipétalo similar a PIN2. En mutantes *mdr4* se observa un gravitropismo disminuido (Terasaka *et al.*, 2005). Además, se reduce el transporte basipétalo en la zona de elongación, produciéndose un aumento en la concentración de auxinas en la punta de la raíz. Es incierto el papel funcional que puede desempeñar un aumento del nivel de esta proteína en un cultivo celular *in vitro*.

Aparte de los genes mencionados, hemos detectado, en diferentes posiciones de gravedad alterada, cambios en la expresión de otros genes relacionados con estrés, como los transportadores *ABC*, *ERD5* y *ERD9* (relacionados con estrés hídrico y estrés por frío), *WRKY40* (inducido en condiciones de estrés que activa la expresión de factores de transcripción), factores de transcripción relacionados con IAAs...

Es importante hacer notar que el incremento en la proliferación celular que nosotros hemos observado como respuesta al estrés gravitatorio (ciertamente producido por mecanismos no convencionales) no es un mecanismo general ni habitual de respuesta a estrés en plantas. Otros estreses, debidos a cambios en otras condiciones ambientales distintas de la gravedad, no causan un aumento en la división celular sino todo lo contrario. Ante una infección por un organismo patógeno se produce una disminución en la expresión de genes relacionados con el progreso del ciclo celular (Logemann *et al.*, 1995), que paran la división celular intentando impedir la progresión

de la infección (Suzuki *et al.*, 2006). De la misma forma, en el caso de estrés hídrico, se observa en maíz un acortamiento del meristemo por prolongación del ciclo celular, como resultado de una reducción de la actividad CDK (Schuppler *et al.*, 1998). Lo atípico de la respuesta al estrés gravitatorio puede deberse a la “novedad” que este estrés supone en la historia evolutiva de las plantas. En comparación con el estrés hídrico, salino o con los diferentes tipos de estreses bióticos, el estrés gravitatorio es el único del que las plantas no tienen “memoria” en los 400 millones de años de su existencia sobre la Tierra, lo que explicaría una respuesta en la coexisten mecanismos comunes y otros específicos.

3.3. Modelo integrado del efecto de la gravedad alterada en proliferación y crecimiento celular

El crecimiento en condiciones de gravedad alterada activa los mecanismos de respuesta al estrés abiótico de la planta y de la célula, lo que se aprecia en el desarrollo de las plantas y el crecimiento de las células, y para ello se altera la expresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular. Sin embargo la respuesta observada a nivel genómico y proteómico no es una respuesta convencional a estrés abiótico (como la que ocurre cuando cambia un parámetro ambiental variable en la tierra, como la temperatura, la humedad y la luz) sino que parece más general, incluyendo algunos mecanismos característicos de la respuesta a estrés biótico y reacciones de defensa más elaboradas. Esta idea de que la alteración de la fuerza gravitatoria es un estímulo suficientemente extraño para la célula como activar un mecanismo de respuesta único ya ha sido propuesta por otros autores (Martzivanou *et al.*, 2006).

Las alteraciones observadas en los genes de ciclo celular y su regulación se indican de modo esquemático en la Figuras 96 y 97. Encontramos diferencias entre los simuladores de fuerza mecánica y de levitación magnética, que se deben principalmente al efecto que ejerce el campo magnético sobre nuestro sistema de estudio. De hecho, los paneles correspondientes a $0g^*$ y $2g^*$ presentan un número sorprendentemente alto de similitudes.

Cuando sometemos a las muestras al doble de la gravedad terrestre se alteran una gran cantidad de genes debido a que las células deben adaptarse a las nuevas condiciones ambientales intentando mantener las condiciones normales de proliferación y crecimiento celular. Se mantiene la progresión normal del ciclo celular, para lo cual se produce un aumento en la expresión de genes relacionados con diferentes etapas del ciclo. A nivel de plántula completa se detectan algunas alteraciones en la proliferación y el crecimiento de las células meristemáticas de la raíz, aunque no muy significativas. A medida que transcurre el tiempo, las células se van adaptando a las nuevas condiciones de crecimiento, reduciéndose las alteraciones encontradas.

En microgravedad simulada se produce el hecho sorprendente de que, aunque observamos una mayor cantidad de efectos globales que en hipergravedad, el número de alteraciones génicas es menor. Encontramos alteraciones en algunas de las etapas del ciclo celular, posiblemente asociadas a una disminución en la duración de la fase G2, por disminución en la acumulación de proteínas relacionadas en esta fase. Un acortamiento de la fase G2 nos llevaría a una disminución en el crecimiento celular y a un aumento de proliferación celular, por menor duración del ciclo, tal y como corroboran nuestros resultados en células proliferantes (tanto en plántulas como en cultivos celulares). Por otra parte, el aumento en la acumulación de auxinas en la zona meristemática en plántulas crecidas durante cuatro días en condiciones de gravedad alterada es un factor importante en el aumento de proliferación celular. El aumento en la concentración de esta fitohormona, en las células corticales, podría promover un aumento en la división celular, por una mayor inducción de genes de respuesta a auxinas, favoreciendo la expresión de genes que aceleran el progreso del ciclo celular.

Así pues, las condiciones ambientales de microgravedad inducen el desacople entre la proliferación y el crecimiento celular, un efecto que ya se había puesto de manifiesto en anteriores trabajos de nuestro laboratorio en microgravedad real o simulada (Manzano *et al.*, 2009; Matía *et al.*, 2007; 2010) y que el uso de nuevos dispositivos, de nuevos métodos de análisis más potentes y de nuevos sistemas biológicos no ha hecho sino confirmar. El desacople entre la proliferación y el crecimiento de las células es un efecto de considerable magnitud, con importantes repercusiones en la fisiología de la célula y, en su caso, de la planta, lo que indica que el

estrés gravitatorio debido a la ausencia de gravedad es mayor que el debido a la hipergravedad, al menos en los valores de g que nosotros hemos experimentado.

Los resultados presentados en esta Memoria suponen un avance en el conocimiento de los mecanismos responsables del mencionado desacople como respuesta al estrés gravitatorio, basados fundamentalmente en alteraciones en el transporte y distribución de auxinas en la raíz. Sin embargo, en experimentos de regeneración en la punta de la raíz, se obtuvo la conclusión que la especificación o la respuesta celular no está solo mediada por auxinas, sino que también están implicados otros factores o mecanismos (Weijers *et al.*, 2006). Será importante investigar, en un futuro próximo, la interacción de estos otros factores con la gravedad en la definición del efecto ejercido por un medio ambiente de notable complejidad sobre los procesos celulares en los que se ha centrado nuestro estudio.

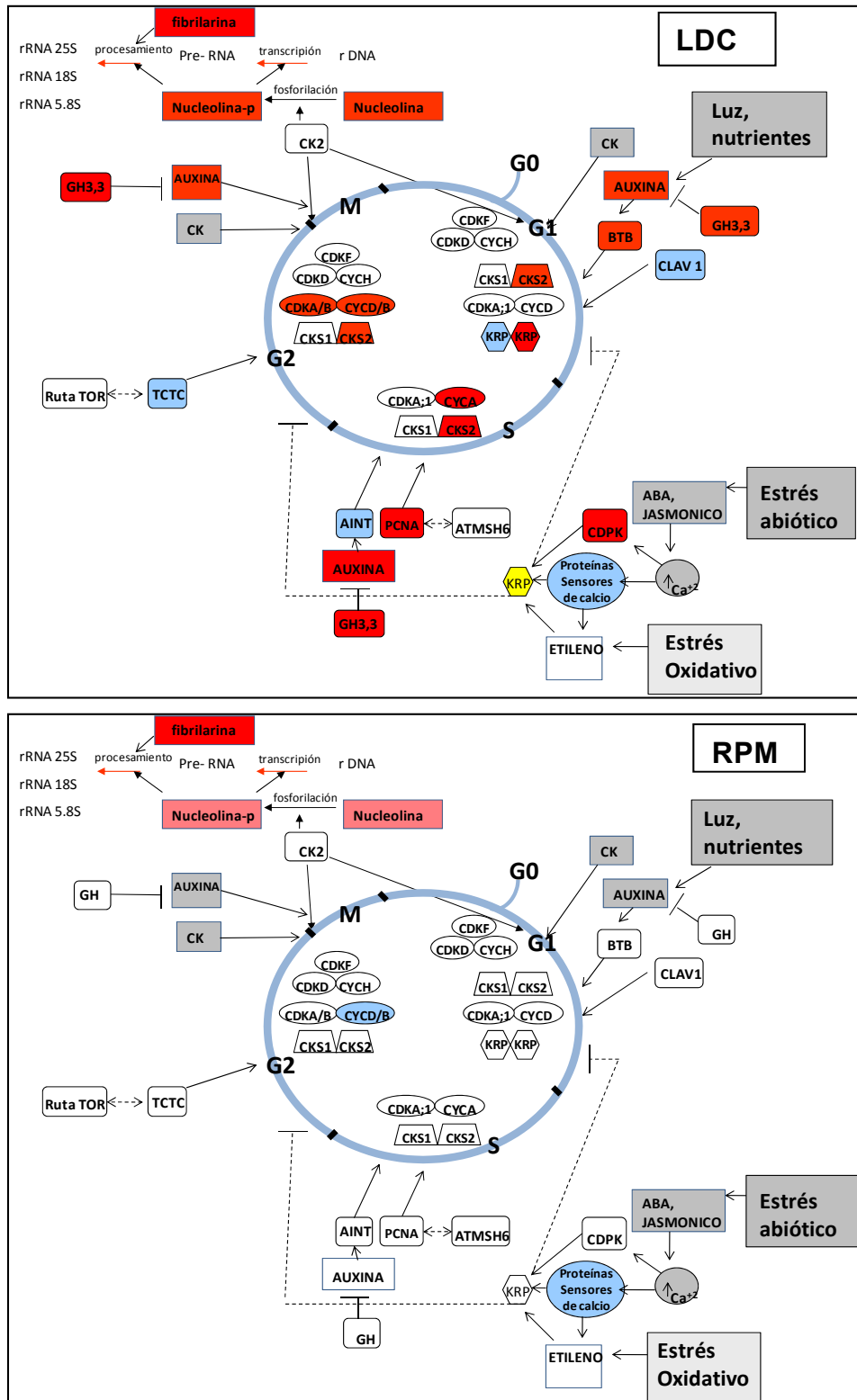


Figura 96. Representación gráfica de las principales proteínas y reguladores del ciclo celular (reguladores, fitohormonas, estreses, condiciones ambientales), en callos de *Arabidopsis thaliana*, en micro- e hiper-gravedad simulada en simuladores de fuerza mecánica. Se representa en gris las condiciones ambientales a las que se encuentran sometidos. En rojo se representan genes y reguladores inducidos en su expresión, así como fitohormonas inducidas, en azul los reprimidos y en amarillo ambas posibilidades. En la posición RPM, se marca la nucleolina L1 en rosa, porque aumenta su expresión génica pero disminuye su biosíntesis y su actividad como proteína.

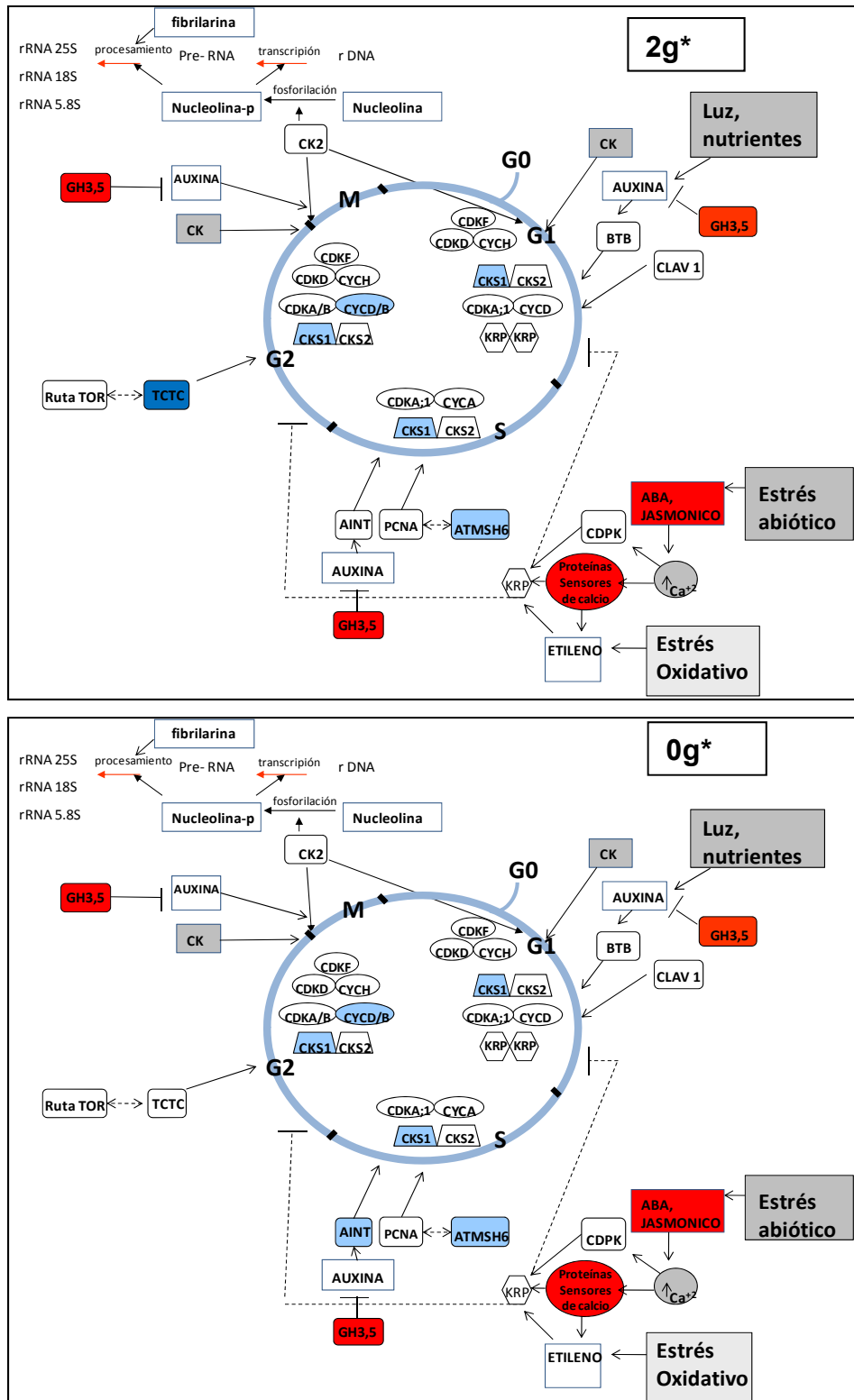


Figura 97. Representación gráfica de las principales proteínas y reguladores del ciclo celular (reguladores, fitohormonas, estreses, condiciones ambientales), en callos de *Arabidopsis thaliana*, en micro- e hiper-gravedad simulada en levitación magnética. Se representa en gris las condiciones ambientales a las que se encuentran sometidos. En rojo se representan genes y reguladores inducidos en su expresión, así como fitohormonas inducidas, en azul los reprimidos y en amarillo ambas posibilidades. En la posición 2g*, se representa en azul más oscuro y refringente la proteína TCTP, en la cual se ha encontrado disminuida su biosíntesis pero no su expresión génica.

4. Nuevas herramientas y perspectivas para futuros experimentos en Microgravedad Real en la Estación Espacial Internacional

Junto con la construcción genética DR5:GFP desarrollada siguiendo protocolos clásicos (Sambrook *et al.*, 1989; Ulmasov *et al.*, 1990) y utilizada en nuestros experimentos gracias a la generosidad del laboratorio de la Dra. Eugénie Carnero-Díaz, las plantas transgénicas que hemos generado asociando los promotores de los genes de la ciclina B1 y de la nucleolina L1 con GFP, completan el trío de herramientas que podrán ser utilizadas en futuros experimentos espaciales (ISS) o en simuladores en Tierra para profundizar en los efectos de las auxinas sobre la proliferación y el crecimiento celular en microgravedad. Con estas herramientas se facilitará el análisis de los resultados por microscopía de fluorescencia (incluyendo la microscopía confocal), dado que permite eliminar el uso de fijadores tóxicos en el espacio. Incluso, si se dispone de microscopio confocal fluorescente en la Estación Espacial Internacional o en los simuladores en Tierra, podríamos observar y estudiar los efectos de la gravedad alterada sobre la expresión de estos genes *in situ* y hasta *in vivo*. Estos estudios de teleciencia (obtención de resultados de un experimento espacial en tiempo real desde tierra) permitirán evaluar la expresión de estos genes clave para este sistema biológico durante los diferentes estadios del desarrollo de las plantas.

Por otro lado, nuestro laboratorio tiene previsto participar en una serie de experimentos espaciales en la ISS, dentro de los proyectos *Seedling Growth*, GENARA B y *Root Cell Proliferation*. *Seedling Growth* es un proyecto codirigido desde nuestro laboratorio en Madrid y el laboratorio del Dr. John Z. Kiss en la Universidad Miami de Oxford, OH, Estados Unidos, en el cual participan las agencias espaciales europea (ESA) y norteamericana (NASA). En estos experimentos se estudiará el crecimiento de las plantas expuestas a luz de diferentes longitudes de onda en microgravedad y gravedad parcial y se harán estudios de biología molecular y celular. La ventaja que tienen además estos experimentos, es que se utilizarán mutantes de auxina y nucleolina, lo que nos dará una información muy valiosa acerca del transporte polar de auxinas y sus modificaciones en las condiciones experimentales. Este planteamiento experimental es de gran interés para detectar las causas y los

mecanismos de la acumulación de auxinas en la punta de la raíz, que hemos detectado en microgravedad simulada.

Por otra parte en los proyectos GENARA B y *Root Cell Proliferation* de la Agencia Espacial Europea participan diferentes países y están codirigidos por nuestro laboratorio y el laboratorio de la Dra. Carnero-Díaz. En estos experimentos se estudiarán el crecimiento y desarrollo de plántulas a diferentes días de crecimiento, expuestas a luz blanca. Se utilizarán para ello varios mutantes de auxinas y plantas silvestres, para la realización de estudios morfológicos, de microscopía confocal y electrónica y estudios a nivel molecular de genómica y proteómica. En el curso de la realización de esta Tesis se ha participado en los trabajos preparatorios y tests metodológicos necesarios para la realización de estos experimentos en el espacio.

CONCLUSIONES

1. La microgravedad simulada efectiva obtenida por levitación magnética ($0g^*$) altera el crecimiento y la proliferación celular en el meristemo de la raíz de plántulas etioladas de dos y cuatro días, apareciendo desacoplados dos procesos que están estrechamente relacionados en condiciones de gravedad terrestre: la proliferación celular, que se incrementa y el crecimiento celular, que disminuye, respecto a los respectivos valores del control $1g$. Al igual que en experimentos previos en la Estación Espacial Internacional (ISS) o en la *Random Positioning Machine* (RPM), que muestran también este desacople, la expresión del gen de la ciclina B1, marcador de la proliferación celular y regulador de la entrada en mitosis, aparece sorprendentemente disminuida en $0g^*$, a pesar del aumento en la tasa de división celular.
2. La hipergravedad es un estrés menos intenso que la microgravedad para las plantas, según muestran los efectos sobre la proliferación y el crecimiento celular, que son cuantitativamente menores que los obtenidos en microgravedad simulada, tanto en el caso de la levitación magnética (posición $2g^*$) como en la Centrífuga de Gran Diámetro ($2g$ y $6g$). En el caso de la Centrífuga, en el que es más factible aislar los efectos exclusivos de la alteración gravitatoria de los factores ambientales debidos al aparato, la hipergravedad también produce un evidente efecto de desacople entre proliferación y crecimiento celular y una modificación de la expresión de ciclina B1 de sentido opuesto al encontrado en microgravedad y cierta menor intensidad.
3. El efecto del estrés gravitatorio puede suavizarse optimizando las condiciones ambientales de cultivo de las plantas. Una mayor disponibilidad energética, obtenida aumentando la concentración de sacarosa del medio para minimizar el efecto de la ausencia de luz, modera el efecto más temprano de la microgravedad sobre las células proliferantes (el registrado a los dos días de la germinación), aunque ya a los cuatro días los niveles de las alteraciones son similares, independientemente de la concentración de sacarosa en el medio.
4. Las condiciones de microgravedad y también el campo magnético de alta intensidad, inhiben, al menos parcialmente, el transporte polar de auxinas, según el patrón de tinción GUS de la raíz de plántulas transgénicas DR5:*uidA* en las que puede visualizarse la expresión de un gen inducible por auxinas. Esto se manifiesta en una elevada concentración de auxinas en la zona distal de la raíz, que puede relacionarse con el incremento irregular en la tasa de

proliferación celular observado en el meristemo radicular en estas condiciones. Sin embargo, la hipergravedad no altera el transporte polar de auxinas.

5. Además de la conocida respuesta al estrés gravitatorio mediada por la percepción y la transducción de la señal realizada por tejidos y órganos especializados de la planta, las células individuales poseen mecanismos sensores de la gravedad y son capaces de elaborar una respuesta a este estrés, claramente detectable. Esta respuesta celular es detectada en los cultivos celulares *in vitro*, en los que la microgravedad induce alteraciones del crecimiento y la proliferación celular comparables a las encontradas en plántulas, incluso teniendo en cuenta que la exposición a la microgravedad es mucho más corta en el caso del cultivo celular que en las plántulas. Los efectos más destacados de esta respuesta en los cultivos celulares son:
 - a. la desregulación del ciclo celular, manifestada tanto en la alteración de las proporciones de las distintas fases (y probablemente de la duración del ciclo), como en el cambio en la expresión de numerosos genes reguladores que intervienen en los puntos de chequeo (*checkpoints*) de las transiciones entre fases del ciclo, y
 - b. la desregulación de la biogénesis de los ribosomas, manifestada en la alteración de la estructura nucleolar y en los cambios transcripcionales y post-traduccionales en proteínas claves del proceso, como nucleolina y fibrilarina.
6. La hipergravedad produce la alteración en la expresión de numerosos genes en las células en cultivo *in vitro*, pero este efecto no se manifiesta en cambios en la duración del ciclo celular ni en ninguna de sus fases.
7. Un elevado campo magnético potencia el efecto de la alteración gravitatoria y produce por sí solo alteraciones funcionales, tanto en las plántulas como en las células en cultivo. Esto se ha puesto en evidencia por la comparación de los efectos obtenidos en posiciones del Levitador magnético correspondientes a niveles similares de gravedad efectiva, pero de muy diferente intensidad en el campo magnético, y también por los efectos encontrados en la posición del Levitador magnético en la que se anula el gradiente de campo y no cambia la gravedad efectiva percibida por las muestras biológicas (1g*). Sin embargo, no ha sido posible discriminar la contribución diferencial del estrés magnético y del estrés gravitacional a las alteraciones encontradas en los experimentos realizados en el Levitador magnético.

8. Los simuladores de gravedad alterada basados en fuerzas mecánicas son, en general, una mejor elección para realizar estudios en Tierra que los basados en la levitación diamagnética del agua, ya que el campo magnético al que se someten las muestras biológicas en estos últimos es tan fuerte que interfiere con los mecanismos fisiológicos como un factor de estrés adicional, difícilmente separable del gravitatorio. Sin embargo, esta tecnología magnética es la única que nos permite simular, al mismo tiempo y en el mismo entorno ambiental, diferentes condiciones de gravedad alterada, e incluso nos permite obtener condiciones de gravedad intermedia, simulando la gravedad de Marte (0,37g) o la de la Luna (0,17g).
9. Hemos aportado una contribución significativa a la mejor eficacia y rendimiento de futuros experimentos espaciales o en Tierra, mediante la generación de dos construcciones genéticas nuevas y sus correspondientes plantas transgénicas, que posibilitarán el seguimiento de la expresión génica en tiempo real, sin necesidad de fijación. En ambas construcciones, la expresión del gen reportero de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) se ha puesto bajo el control del promotor de un gen de gran interés en estudios similares al presente. La primera construcción (AtNUCL1:GFP) permitirá evaluar la biogénesis de los ribosomas (estimación del crecimiento celular) y la segunda construcción (CYCB1:GFP) permitirá evaluar la proliferación celular, en ambos casos por observación microscópica directa.
10. Por último, el crecimiento de las plantas en condiciones de gravedad distintas a las terrestres produce una respuesta de estrés atípica, diferente de las respuestas conocidas a otras condiciones de estrés abiótico (estrés hídrico, térmico, salino, etc.), aunque incluye algunos mecanismos de respuesta comunes. La causa de esta especificidad de respuesta al estrés gravitatorio habría que buscarla en la novedad que supone la alteración de la gravedad ambiental en el contexto de la historia evolutiva de las plantas. A lo largo de esta historia, las plantas han debido afrontar cambios en la temperatura, en la disponibilidad de agua o en la concentración salina, pero nunca en la intensidad del vector gravedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, S. U., Buechel, S., Zhao, Z., Ljung, K., Novak, O., Busch, W., Schuster, C. y Lohmann, J. U. (2008). Requirement of B2-type cyclin-dependent kinases for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20(1): 88-100.
- Aris, J. P. y Blobel, G. (1991). cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3): 931-935.
- Babbick, M., Dijkstra, C., Larkin, O. J., Anthony, P., Davey, M. R., Lowe, K. C., Cogoli-Greuter, M. y Hampp, R. (2007). Expression of transcription factors after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures to hypergravity and simulated microgravity (2-D/3-D clinostation, magnetic levitation). *Adv Space Res* 39: 1182-1189.
- Barjaktarovic, Z., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Fladerer, C., Madlung, J. y Hampp, R. (2007). Time-course of changes in amounts of specific proteins upon exposure to hyper-g, 2-D clinorotation, and 3-D random positioning of *Arabidopsis* cell cultures. *J Exp Bot* 58(15-16): 4357-4363.
- Barjaktarovic, Z., Schutz, W., Madlung, J., Fladerer, C., Nordheim, A. y Hampp, R. (2009). Changes in the effective gravitational field strength affect the state of phosphorylation of stress-related proteins in callus cultures of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 60(3): 779-789.
- Barmicheva, E. M., Grif, V. G. y Tairbekov, M. G. (1989). Growth and structure of cells in the maize root apex under space flight conditions. *Cytology* 31: 1324-1328
- Barnouin, K., Dubuisson, M. L., Child, E. S., Fernandez de Mattos, S., Glassford, J., Medema, R. H., Mann, D. J. y Lam, E. W. (2002). H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem* 277(16): 13761-13770.
- Baserga, R. (1984). Growth in size and cell DNA replication. *Exp Cell Res* 151(1): 1-5.
- Beemster, G. T. y Baskin, T. I. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116(4): 1515-1526.
- Belenguer, P., Baldin, V., Mathieu, C., Prats, H., Bensaid, M., Bouche, G. y Amalric, F. (1989). Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17(16): 6625-6636.
- Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Labbe, J. C., Doree, M. y Amalric, F. (1990). Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. *Mol Cell Biol* 10(7): 3607-3618.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 57: 289-300.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P. y Offringa, R. (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* 128(20): 4057-4067.
- Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W. y Benfey, P. N. (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* 302(5652): 1956-1960.
- Bisova, K., Krylov, D. M. y Umen, J. G. (2005). Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 137(2): 475-491.

- Bogre, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D. T., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E. y Hirt, H. (1996). Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucMs1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell* 8(3): 417-428.
- Boudolf, V., Inze, D. y De Veylder, L. (2006). What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? *Trends Plant Sci* 11(10): 474-479.
- Boudolf, V., Rombauts, S., Naudts, M., Inze, D. y De Veylder, L. (2001). Identification of novel cyclin-dependent kinases interacting with the CKS1 protein of Arabidopsis. *J Exp Bot* 52(359): 1381-1382.
- Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I. y Tainer, J. A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 84(6): 863-874.
- Bouvet, P., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Madjar, J. J. y Amalric, F. (1998). Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* 273(30): 19025-19029.
- Brown, A. H. (1992). Centrifuges: evolution of their uses in plant gravitational biology and new directions for research on the ground and in spaceflight. *ASGSB Bull* 5(2): 43-57.
- Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M. O. y Olson, M. O. (1987). Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. *Biochemistry* 26(24): 7876-7883.
- Caroline, R., Lescot, M., Inzé, D. y De Veylder, L. (2002). Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures. *Plant Cell* 69: 167-176.
- Carpentier, M., Morelle, W., Coddeville, B., Pons, A., Masson, M., Mazurier, J. y Legrand, D. (2005). Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry* 44(15): 5804-5815.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P. J. y Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* 13(4): 843-852.
- Centis-Aubay, S., Gasset, G., Mazars, C., Ranjeva, R. y Graziana, A. (2003). Changes in gravitational forces induce modifications of gene expression in A. thaliana seedlings. *Planta* 218(2): 179-185.
- Cerdido, A. y Medina, F. J. (1995). Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma* 103(9): 625-634.
- Cockcroft, C., den Boer, B. G. W., Healy, J. M. S. y Murray, J. A. H. (2000). Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* 405: 575-579.
- Coelho, C. M., Dante, R. A., Sabelli, P. A., Sun, Y., Dilkes, B. P., Gordon-Kamm, W. J. y Larkins, B. A. (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol* 138(4): 2323-2336.
- Coleman, C. B., González-Villalobos, R. A., Allen, P. L., Johanson, K., Guevorkian, K., Valles, J. M. y Hammond, T. G. (2007). Diamagnetic levitation changes growth, cell cycle, and gene expression of Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol Bioeng* 98(4): 854-863.
- Conlon, I. y Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell* 96(2): 235-244.
- Cools, T., Iantcheva, A., Maes, S., Van den Daele, H. y De Veylder, L. (2010). A replication stress-induced synchronization method for Arabidopsis thaliana root meristems. *Plant J* 64(4): 705-714.
- Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., Shen, W. H., Dong, A. y Genschik, P. (2000). Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *Plant J* 24(6): 763-773.

- Cutler, S. R., Rodríguez, P. L., Finkelstein, R. R. y Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* 61: 651-679.
- Cuvier, O. y Hirano, T. (2003). A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J Cell Biol* 160(5): 645-655.
- Chaubet, N., Flenet, M., Clement, B., Brignon, P. y Gigot, C. (1996). Identification of cis-elements regulating the expression of an Arabidopsis histone H4 gene. *Plant J* 10(3): 425-435.
- Cheng, S. H., Willmann, M. R., Chen, H. C. y Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* 129(2): 469-485.
- Christianen, P. C. M. (2010). Tuneable gravity using strong gradient magnetic fields. *News letter Elgra* 7: 9-12.
- Churchman, M. L., Brown, M. L., Kato, N., Kirik, V., Hulskamp, M., Inze, D., De Veylder, L., Walker, J. D., Zheng, Z., Oppenheimer, D. G., Gwin, T., Churchman, J. y Larkin, J. C. (2006). SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 18(11): 3145-3157.
- Darbelley, N., Driss-Ecole, D. y Perbal, G. (1989). Elongation and mitotic activity of cortical cells in lentil roots grown in microgravity. *Plant Physiol. Biochem* 27: 341-347.
- Darwin, C.A. y Darwin, F. (1880). The power of movement in Plant.
- de Carcer, G. y Medina, F. J. (1999). Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J Struct Biol* 128(2): 139-151.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacquemard, A., Engler, G. y Inze, D. (2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* 21(6): 1360-1368.
- De Veylder, L., Beemster, G. T., Beeckman, T. y Inze, D. (2001). CKS1At overexpression in Arabidopsis thaliana inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J* 25(6): 617-626.
- De Veylder, L., Segers, A. G., Casteels, P., Van Montagu, M. y Inzé, D. (1997). The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2bAt. *FEBS letters* 412: 446-452.
- Deming, P. B., Cistulli, C. A., Zhao, H., Graves, P. R., Piwnicka-Worms, H., Paules, R. S., Downes, C. S. y Kaufmann, W. K. (2001). The human decatenation checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(21): 12044-12049.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H. S., Chilcott, C., Zhu, T. y Turner, J. G. (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* 58(4): 497-513.
- Dewitte, W. y Murray, J. A. (2003). The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54: 235-264.
- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K., Dharmasiri, N., Singh, S. K., Kowalchuk, M., Marchant, A., Mills, S., Sandberg, G., Bennett, M. J. y Estelle, M. (2006). AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* 312(5777): 1218-1220.
- Di Lorenzo, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A. y Benfey, P. N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86(3): 423-433.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., Pusch, S., De Schutter, K., Alvim Kamei, C.L., Nowack, M.K., Novak, B., Duan, G.L., Zhu, Y.G., De Veylder, L. y Schnittger, A. (2009). Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the Arabidopsis Cdk1 homolog CDKA1. *Plant Cell* 21(11): 3641-3654.

- Dudits, D., Abraham, E., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Bilgin, M. y Horvath, G. V. (2011). Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Ann Bot.* 107(7): 1193-202.
- Dunphy, W. G. y Newport, J. W. (1989). Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus cdc2* protein kinase. *Cell* 58(1): 181-191.
- Eichler, G. S., Huang, S. y Ingber, D. E. (2003). Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI): for integrative analysis of expression profiles. *Bioinformatics* 19: 2321-2322.
- Esau, K. (1977). Anatomy of Seed Plants. *New York: Wiley*.
- Escande, M. L., Gas, N. y Stevens, B. J. (1985). Immunolocalization of the 100 K nucleolar protein in CHO cells. *Biol Cell* 53(2): 99-109.
- Ferreira, P. C., Hemerly, A. S., Engler, J. D., van Montagu, M., Engler, G. y Inze, D. (1994). Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell* 6(12): 1763-1774.
- Ferreira, P. C., Hemerly, A. S., Villarroel, R., Van Montagu, M. y Inze, D. (1991). The Arabidopsis functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell* 3(5): 531-540.
- Finkelstein, R. R. y Somerville, C. R. (1990). Three Classes of Abscisic Acid (ABA)-Insensitive Mutations of Arabidopsis Define Genes that Control Overlapping Subsets of ABA Responses. *Plant Physiol* 94(3): 1172-1179.
- Fiorani, F. y Beemster, G. T. (2006). Quantitative analyses of cell division in plants. *Plant Mol Biol* 60(6): 963-979.
- Fitzelle, K. J. y Kiss, J. Z. (2001). Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of Arabidopsis by hypergravity. *J Exp Bot* 52(355): 265-275.
- Flórez, M., Carbonell, M. V. y Martínez, E. (2007). Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: Effects on germination and early growth. *Env Exp Bot* 59: 68-75.
- Francis, D. (2007). The plant cell cycle--15 years on. *New Phytol* 174(2): 261-278.
- Francis, D. (2011). A commentary on the G/M transition of the plant cell cycle. *Ann Bot* 107(7): 1065-1070.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. y Jurgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426(6963): 147-153.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K. y Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415(6873): 806-809.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwkerk, P. B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P. J., Palme, K. y Offringa, R. (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306(5697): 862-865.
- Fujie, M., Kuroiwa, H., Suzuki, T. y Kuroiwa, T. (1993). Organelle DNA synthesis in the quiescent centre of Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 44: 690-693
- Furutani, M., Vernoux, T., Traas, J., Kato, T., Tasaka, M. y Aida, M. (2004). PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis. *Development* 131(20): 5021-5030.
- Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. y Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282(5397): 2226-2230.
- Gaudin, V., Lunness, P. A., Fobert, P. R., Towers, M., Riou-Khamlichi, C., Murray, J. A., Coen, E. y Doonan, J. H. (2000). The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. *Plant Physiol* 122(4): 1137-1148.

- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. y Jurgens, G. (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112(2): 219-230.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G. y Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413(6854): 425-428.
- Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F. y Erard, M. (1992). Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem* 209(2): 541-548.
- Gimenez-Abian, J. F., Weingartner, M., Binarova, P., Clarke, D. J., Anthony, R. G., Calderini, O., Heberle-Bors, E., Moreno Diaz de la Espina, S., Bogre, L. y De la Torre, C. (2002). A topoisomerase II-dependent checkpoint in G2-phase plant cells can be bypassed by ectopic expression of mitotic cyclin B2. *Cell Cycle* 1(3): 187-192.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. y Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112 (Pt 6): 761-772.
- Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P. C., Bouvier-Durand, M. y Vartanian, N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* 26(5): 1557-1577.
- Goessens, G. (1976). The nucleolar fibrillar centres in various cell types in vivo or in vitro. *Cell Tissue Res* 173(3): 315-324.
- González-Camacho, F. y Medina, F. J. (2004). Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis. *Proteomics* 4(2): 407-417.
- González-Camacho, F. y Medina, F. J. (2006). The nucleolar structure and the activity of NopA100, a nucleolin-like protein, during the cell cycle in proliferating plant cells. *Histochem Cell Biol* 125(1-2): 139-153.
- González-Camacho, F. y Medina, F. J. (2005). The nucleolar structure and nucleolar proteins as indicators of cell proliferation events in plants. *J. Appl. Biomed* 3: 167-174.
- Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N. y Giraudat, J. (1995). Abscisic acid-dependent and -independent regulation of gene expression by progressive drought in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet* 246(1): 10-18.
- Guo, G., Wang, W. y Bradley, A. (2004). Mismatch repair genes identified using genetic screens in Blm-deficient embryonic stem cells. *Nature* 429(6994): 891-895.
- Hampp, R., Hoffmann, E., Schonherr, K., Johann, P. y De Filippis, L. (1997). Fusion and metabolism of plant cells as affected by microgravity. *Planta* 203 Suppl: S42-53.
- Hannan, R. D. y Rothblum, L. I. (1995). Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res* 30(4): 501-510.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C. y Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2122-2127.
- Hayles, J., Aves, S. y Nurse, P. (1986). *suc1* is an essential gene involved in both the cell cycle and growth in fission yeast. *EMBO J* 5(12): 3373-3379.
- Herranz, R., Benguria, A., Lavan, D. A., Lopez-Vidriero, I., Gasset, G., Javier Medina, F., van Loon, J. J. y Marco, R. (2010). Spaceflight-related suboptimal conditions can accentuate the altered gravity response of Drosophila transcriptome. *Mol Ecol.* 19: 4255-4264.
- Hilaire, E., Peterson, B. V., Guikema, J. A. y Brown, C. S. (1996). Clinorotation affects morphology and ethylene production in soybean seedlings. *Plant Cell Physiol* 37(7): 929-934.
- Hill, R. J. A. (2010). Stable diamagnetic levitation of water droplets and biological organisms. *Elgra News letter* 7: 12-15.

- Hindley, J., Phear, G., Stein, M. y Beach, D. (1987). Suc1+ encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 7(1): 504-511.
- Ho, S. L., Chao, Y. C., Tong, W. F. y Yu, S. M. (2001). Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol* 125: 877-890.
- Hong, F. y Breitling, R. (2007). A comparison of meta-analysis methods for detecting differentially expressed genes in *microarray* experiments. *Bioinformatics* 24: 374-382.
- Hoson, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M. y Buchen, B. (1997). Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta* 203 Suppl: S187-197.
- Hoson, T., Matsumoto, S., Soga, K. y Wakabayashi, K. (2010). Cortical microtubules are responsible for gravity resistance in plants. *Plant Signal Behav* 5(6): 752-754.
- Ingber, D. E. (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 20(7): 811-827.
- Inze, D. y De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40: 77-105.
- Ishii, Y., Hoson, T., Kamisaka, S., Miyamoto, K., Ueda, J., Mantani, S., Fujii, S., Masuda, Y. y Yamamoto, R. (1996). Plant growth processes in *Arabidopsis* under microgravity conditions simulated by a clinostat. *Biol Sci Space* 10(1): 3-7.
- Iversen, T. H., Odegaard, E., Beisvag, T., Johnsson, A. y Rasmussen, O. (1996). The behaviour of normal and agravitropic transgenic roots of rapeseed (*Brassica napus* L.) under microgravity conditions. *J Biotechnol* 47(2-3): 137-154.
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, C., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C. y Glab, N. (2002). The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *J Cell Sci* 115(Pt 5): 973-982.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inze, D., Umeda, M. y Renaudin, J. P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 43(5-6): 607-620.
- Kaiser, P., Moncollin, V., Clarke, D. J., Watson, M. H., Bertolaet, B. L., Reed, S. I. y Bailly, E. (1999). Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. *Genes Dev* 13(9): 1190-1202.
- Kavi, P. S. (1983). The effect of non-homogeneous gradient magnetic field susceptibility values in situ ragi seed material. *Mysore J Agric Sci* (17): 121-123.
- Kerr, I. D. y Bennett, M. J. (2007). New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem J* 401(3): 613-622.
- Kimbrough, J. M., Salinas-Mondragon, R., Boss, W. F., Brown, C. S. y Sederoff, H. W. (2004). The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Physiol* 136: 2790-2805.
- King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. y Kirschner, M. W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274(5293): 1652-1659.
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540.
- Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Tabata, S., Sáez-Vásquez, J., Echeverría, M., Nakagawa, T., Ishiguro, S. y Nakamura, K. (2007). Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J* 49(6): 1053-1063.
- Kono, A., Umeda-Hara, C., Lee, J., Ito, M., Uchimiya, H. y Umeda, M. (2003). *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* 132(3): 1315-1321.

- Koroleva, O. A., Tomlinson, M., Parinyapong, P., Sakvarelidze, L., Leader, D., Shaw, P. y Doonan, J. H. (2004). CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. *Plant Cell* 16(9): 2364-2379.
- Kudla, J., Batistic, O. y Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22(3): 541-563.
- Kuznetsov, O. A. y Hasenstein, K. H. (1996). Intracellular magnetophoresis of amyloplasts and induction of root curvature. *Planta* 198(1): 87-94.
- Landrieu, I., da Costa, M., De Veylder, L., Dewitte, F., Vandepoele, K., Hassan, S., Wieruszkeski, J. M., Corellou, F., Faure, J. D., Van Montagu, M., Inze, D. y Lippens, G. (2004). A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36): 13380-13385.
- Lapeyre, B., Amalric, F., Ghaffari, S. H., Rao, S. V., Dumbar, T. S. y Olson, M. O. (1986). Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J Biol Chem* 261(20): 9167-9173.
- Lee, J., Das, A., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Tsutsumi, N., Uchimiya, H. y Umeda, M. (2003). Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *Plant J* 34(4): 417-425.
- Leger-Silvestre, I., Gulli, M. P., Noaillac-Depeyre, J., Faubladiere, M., Sicard, H., Caizergues-Ferrer, M. y Gas, N. (1997). Ultrastructural changes in the *Schizosaccharomyces pombe* nucleolus following the disruption of the *gar2+* gene, which encodes a nucleolar protein structurally related to nucleolin. *Chromosoma* 105(7-8): 542-552.
- Leitinger, N. y Wesierska-Gadek, J. (1993). ADP-ribosylation of nucleolar proteins in HeLa tumor cells. *J Cell Biochem* 52(2): 153-158.
- Lischwe, M. A., Richards, R. L., Busch, R. K. y Busch, H. (1981). Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. *Exp Cell Res* 136(1): 101-109.
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. y Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17(4): 1090-1104.
- Logemann, E., Wu, S. C., Schroder, J., Schmelzer, E., Somssich, I. E. y Hahlbrock, K. (1995). Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *Plant J* 8(6): 865-876.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P. y Fink, G. R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 12(14): 2175-2187.
- Maccarrone, G., Turck, C. W. y Martins-de-Souza, D. (2010). Shotgun mass spectrometry workflow combining IEF and LC-MALDI-TOF/TOF. *Protein J* 29(2): 99-102.
- Maere, S., Heymans, K. y Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21(16): 3448-3449.
- Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Koncz, C. y Dudits, D. (1997). Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9(2): 223-235.
- Malladi, A. y Johnson, L. K. (2011). Expression profiling of cell cycle genes reveals key facilitators of cell production during carpel development, fruit set, and fruit growth in apple (*Malus domestica* Borkh.). *J Exp Bot* 62(1): 205-219.

- Manzano, A. I., Matía, I., González-Camacho, F., Carnero-Díaz, E., van Loon, J. J. W. A., Dijkstra, C., Larkin, O., Anthony, P., Davey, M. R., Marco, R. y Medina, F. J. (2009). Germination of Arabidopsis seed in space and in simulated microgravity: alterations in root cell growth and proliferation. *Microgravity Sci Technol* 21: 293-297.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. y Bennett, M. J. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* 18(8): 2066-2073.
- Martin, M., Garcia-Fernandez, L. F., Diaz de la Espina, S. M., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N. y Javier Medina, F. (1992). Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp Cell Res* 199(1): 74-84.
- Martzivanou, M., Babbick, M., Cogoli-Greuter, M. y Hampp, R. (2006). Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of Arabidopsis thaliana cell cultures. *Protoplasma* 229(2-4): 155-162.
- Martzivanou, M. y Hampp, R. (2003). Hyper-gravity effects on the Arabidopsis transcriptome. *Physiol Plant* 118(2): 221-231.
- Masuda, H. P., Cabral, L. M., De Veylder, L., Tanurdzic, M., de Almeida Engler, J., Geelen, D., Inze, D., Martienssen, R. A., Ferreira, P. C. y Hemerly, A. S. (2008). ABAP1 is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription. *EMBO J* 27(20): 2746-2756.
- Matía, I., González-Camacho, F., Herranz, R., Kiss, J. Z., Gasset, G., van Loon, J. J., Marco, R. y Javier Medina, F. (2010). Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. *J Plant Physiol* 167(3): 184-193.
- Matía, I., González-Camacho, F., Marco, R., Kiss, J. Z., Gasset, G. y Medina, F. J. (2005). Nucleolar structure and proliferation activity of Arabidopsis root cells from seedlings germinated on International Space Station. *Adv Space Res* 36: 1244-1253
- Matía, I., González-Camacho, F., Marco, R., Kiss, J. Z., Gasset, G., van Loon, J. W. A. y Medina, F. J. (2007). Seed germination and seedling growth under simulated microgravity causes alterations in plant cell proliferation and ribosome biogenesis. *Microgravity Sci Technol*. 21(1-2): 169-174.
- May, M. J. y Leaver, C. J. (1993). Oxidative Stimulation of Glutathione Synthesis in Arabidopsis thaliana Suspension Cultures. *Plant Physiol* 103(2): 621-627.
- Medina, F. J., Cerdido, A. y De Cárcer, G. (2000). The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur. J. Histochem* 44: 117-131.
- Medina, F. J., Cerdido, A. y Fernandez-Gomez, M. E. (1995). Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp Cell Res* 221(1): 111-125.
- Medina, F. J., González-Camacho, F., Manzano, A. I., Mantrique, A. y Herranz, R. (2010). Nucleolin, a major multifunctional nucleolar phosphoprotein of proliferating cells. *J Appl Biomed* 8: 141-150.
- Medina, F. J. y Herranz, R. (2010). Microgravity environment uncouples cell growth and cell proliferation in root meristematic cells: the mediator role of auxin. *Plant Signal Behav* 5(2): 176-179.
- Meinke, D. y Koorn, M. (1997). Community standards for Arabidopsis genetic. *Plant J* 12:247-253.
- Menand, B., Marechal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A. y Wintz, H. (1998). A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 11014-11019.

- Menges, M., de Jager, S. M., Gruissem, W. y Murray, J. A. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41(4): 546-566.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W. y Murray, J. A. (2002). Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *J Biol Chem* 277(44): 41987-42002.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W. y Murray, J. A. (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol Biol* 53(4): 423-442.
- Menges, M. y Murray, J. A. (2002). Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J* 30(2): 203-212.
- Menges, M. y Murray, J. A. (2006). Synchronization, Transformation, and Cryopreservation of Suspension-Cultured Cells. *Methods Mol Biol* 323: 45-61.
- Mizukami, Y. (2001). A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Curr Opin Plant Biol* 4(6): 533-539.
- Mizukami, Y. y Fischer, R. L. (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 942-947.
- Monshausen, G. B. y Sievers, A. (2002). Basipetal propagation of gravity-induced surface pH changes along primary roots of *Lepidium sativum* L. *Planta* 215: 980-988.
- Morimoto, H., Okamura, H. y Haneji, T. (2002). Interaction of protein phosphatase 1 delta with nucleolin in human osteoblastic cells. *J Histochem Cytochem* 50(9): 1187-1193.
- Moseyko, N., Zhu, T., Chang, H. S., Wang, X. y Feldman, L. J. (2002). Transcription profiling of the early gravitropic response in Arabidopsis using high-density oligonucleotide probe microarrays. *Plant Physiol* 130(720-728).
- Mougey, E. B., Pape, L. K. y Sollner-Webb, B. (1993). A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol Cell Biol* 13(10): 5990-5998.
- Muday, G. K. y Haworth, P. (1994). Tomato root growth, gravitropism, and lateral development: correlation with auxin transport. *Plant Physiol Biochem* 32(2): 193-203.
- Muller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. y Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J* 17(23): 6903-6911.
- Myers, J. (1954). Basic remarks on the use of plants as biological gas exchangers in a closed system. *J Aviat Med* 25(4): 407-411.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M. y Shinmyo, A. (2002). Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 14(8): 1847-1857.
- Nakaya, M., Tsukaya, H., Murakami, N. y Kato, M. (2002). Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 43(2): 239-244.
- Nickerson, C. A., Ott, C. M., Wilson, J. W., Ramamurthy, R. y Pierson, D. L. (2004). Microbial responses to microgravity and other low-shear environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 345-361.
- Niklas, K. J. (1994). Plant Allometry: The Scaling of Form and process. *Chicago: The University of Chicago Press*.
- Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Spohn, W. H. y Busch, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell* 54(2): 123-133.
- Oka, M., Ueda, J., Miyamoto, K., Yamamoto, R., Hoson, T. y Kamisaka, S. (1995). Effect of simulated microgravity on auxin polar transport in inflorescence axis of Arabidopsis thaliana. *Biol Sci Space* 9(4): 331-336.
- Oliveros, J. C. (2007). FIESTA Viewer: Gene Expression data handling made easy. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>.

- Olson, M. O. J. (1991). The role of proteins in nucleolar structure and function. "The eukaryotic nucleus. Molecular biochemistry and macromolecular assemblies". (P.R. Strauss, y S.H. Wilson, eds). *The Telford Press. Caldwell, New Jersey*: 519-559.
- Park, J. E., Park, J. Y., Kim, Y. S., Staswick, P. E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S. Y., Kim, J., Lee, Y. H. y Park, C. M. (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282(13): 10036-10046.
- Patra, D., Wang, S. X., Kumagai, A. y Dunphy, W. G. (1999). The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G2/M regulators. *J Biol Chem* 274(52): 36839-36842.
- Paul, A. L., Ferl, R. J. y Meisel, M. W. (2006). High magnetic field induced changes of gene expression in arabidopsis. *Biomagn Res Technol* 4: 7.
- Perbal, G. (1971). Action de la pesanteur sur la répartition des organites dans les cellules axiales centrales (statenchyme) de la coiffe du Lens caulinaris L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série D* 273: 789-792
- Perbal, G., Driss-Ecole, D., Rutin, J., Salle, G.(1987) Graviperception of lentil seedling roots grown in space (Spacelab D1 Mission). *Physiol Plant* 70, 119-126.
- Perbal, G. (2001). The role of gravity in plant development. In: *Seibert, G. (Ed), A world without Gravity. European Space Agency, Noordwijk.* (121-136).
- Peres, A., Churchman, M. L., Hariharan, S., Himanen, K., Verkest, A., Vandepoele, K., Magyar, Z., Hatzfeld, Y., Van Der Schueren, E., Beemster, G. T., Frankard, V., Larkin, J. C., Inze, D. y De Veylder, L. (2007). Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J Biol Chem* 282(35): 25588-25596.
- Petricka, J. J. y Nelson, T. M. (2007). Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol* 144(1): 173-186.
- Pettko-Szandtner, A., Meszaros, T., Horvath, G. V., Bako, L., Csordas-Toth, E., Blastyak, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P. y Dudits, D. (2006). Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J* 46(1): 111-123.
- Pih, K. T., Yi, M. J., Liang, Y. S., Shin, B. J., Cho, M. J., Hwang, I. y Son, D. (2000). Molecular cloning and targeting of a fibrillarlin homolog from Arabidopsis. *Plant Physiol* 123(1): 51-58.
- Pontvianne, F., Abou-Elail, M., Douet, J., Comella, P., Matía, I., Chandrasekhara, C., Debures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F. J., Tourmente, S., Pikaard, C. S. y Sáez-Vásquez, J. (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* 6(11): e1001225.
- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F. J., Echeverria, M. y Sáez-Vásquez, J. (2007). Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* 18(2): 369-379.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J. P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R. P., Casteels, P., Van Montagu, M., Inze, D. y Mironov, V. (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J Biol Chem* 276(39): 36354-36360.
- Price, J., Laxmi, A., St Martin, S. K. y Jang, J. C. (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* 16(8): 2128-2150.
- Raska, I. (1995). Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing. *J Cell Biochem* 59(1): 11-26.

- Reichheld, J. P., Chaubet, N., Shen, W. H., Renaudin, J. P. y Gigot, C. (1996). Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13819-13824.
- Reichheld, J. P., Vernoux, T., Lardon, F., Van Montagu, M. y Inzé, D. (1999). Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.* 17: 647-656.
- Renaudin, J. P., Doonan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D. A., Sundaresan, V. y Murray, J. A. (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* 32(6): 1003-1018.
- Richard, C., Granier, C., Inzé, D. y De Veylder, L. (2001). Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *J Exp Bot* (2001) 52 (361): 1625-1633.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A. y Murray, J. A. (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283(5407): 1541-1544.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. y Murray, J. A. (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* 20(13): 4513-4521.
- Risueño, M. C. y Medina, F. J. (1986). The nucleolar structure in plant cells. *Revis Biol Celular* 7: 1-154.
- Rodríguez, P. L. (1998). Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol Biol* 38(6): 919-927.
- Roger, B., Moisand, A., Amalric, F. y Bouvet, P. (2003). Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. *Chromosoma* 111(6): 399-407.
- Roussel, P., Sirri, V. y Hernandez-Verdun, D. (1994). Quantification of Ag-NOR proteins using Ag-NOR staining on western blots. *J Histochem Cytochem* 42(11): 1513-1517.
- Rubery, H. P. (1990). Phytotropins: receptors and endogenous ligands. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 44: 119-146.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. y Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99(5): 463-472.
- Sáez-Vásquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F. y Echeverría, M. (2004). A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Mol Cell Biol* 24(16): 7284-7297.
- Sáez-Vásquez, J. y Medina, F. J. (2008). The plant nucleolus. *Adv Bot Res* 47: 1-46.
- Sahebjamei, H., Abdolmaleki, P. y Ghanati, F. (2007). Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured tobacco cells. *Bioelectromagnetics* 28(1): 42-47.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Savostin, P. W. (1930). Magnetic growth relations in plants. *Planta* 12: 327.
- Scheer, U. y Rose, K. M. (1984). Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(5): 1431-1435.
- Scheres, B., Benfey, P. y Dolan, L. (2002). Root Development. *The Arabidopsis Book*. Amer. Soc. Plant Biologists .
- Schnittger, A., Schobinger, U., Stierhof, Y. D. y Hulskamp, M. (2002). Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes. *Curr Biol* 12(5): 415-420.

- Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schobinger, U. y Hulskamp, M. (2003). Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1 in single-celled Arabidopsis trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell* 15(2): 303-315.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jurgens, G. y Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100(6): 635-644.
- Schuppler, U., He, P. H., John, P. C. y Munns, R. (1998). Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* 117(2): 667-678.
- Schwarzacher, J. C. y Audus, L. J. (1973). Further studies in magnetotropism. *J Exp Bot* 24: 459-474.
- Serin, G., Joseph, G., Faucher, C., Ghisolfi, L., Bouche, G., Amalric, F. y Bouvet, P. (1996). Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie* 78(6): 530-538.
- Shimazu, T., Miyamoto, K. y Ueda, J. (2003). Growth and development, and auxin polar transport of transgenic Arabidopsis under simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat. *Biol Sci Space* 17(4): 288-292.
- Shimotohno, A., Ohno, R., Bisova, K., Sakaguchi, N., Huang, J., Koncz, C., Uchimiya, H. y Umeda, M. (2006). Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis. *Plant J* 47(5): 701-710.
- Sievers, A. y Volkmann, D. (1979). Gravitropism in single cells. . In: Haupt W., Feinleib M.E, eds. *Encyclopedia of plant physiology. Physiology of movements*. Berlin: Springer-Verlag 7: 567-572
- Sirri, V., Roussel, P., Gendron, M. C. y Hernandez-Verdun, D. (1997). Amount of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28(2): 147-156.
- Skyilar, A., Sung, F., Hong, F., Chory, J. y Wu, X. (2011). Metabolic sugar signal promotes Arabidopsis meristematic proliferation via G2. *Dev Biol* 351(1): 82-89.
- Sobol, M., González-Camacho, F., Rodríguez-Vilarino, V., Kordyum, E. y Medina, F. J. (2006). Subnucleolar location of fibrillarin and NopA64 in *Lepidium sativum* root meristematic cells is changed in altered gravity. *Protoplasma* 228(4): 209-219.
- Sobol, M., González-Camacho, F., Rodríguez-Vilariño, V., Kordyum, E. L. y Medina, F. J. (2005). Clinorotation influences rDNA and NopA100 localization in nucleoli. *Adv Space Res* 36: 1254-1262.
- Soga, K. (2004). Perception mechanism of gravistimuli in gravity resistance responses of plants. *Biol Sci Space* 18(3): 92-93.
- Soga, K., Wakabayashi, K., Hoson, T. y Kamisaka, S. (1999). Hypergravity increases the molecular mass of xyloglucans by decreasing xyloglucan-degrading activity in Azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol* 40: 581-585.
- Soto, T., Nunez, A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2007). Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 153(Pt 5): 1519-1529.
- Srivastava, P., Russo, J. y Russo, I. H. (1999). Inhibition of rat mammary tumorigenesis by human chorionic gonadotropin associated with increased expression of inhibin. *Mol Carcinog* 26(1): 10-19.
- Stachel, S. E., Timmerman, B. y Zambryski, P. (1986). Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322: 706-712.

- Stanek, D., Kiss, T. y Raska, I. (2000). Pre-ribosomal RNA is processed in permeabilised cells at the site of transcription. *Eur J Cell Biol* 79(3): 202-207.
- Stepinski, D. (2009). Immunodetection of nucleolar proteins and ultrastructure of nucleoli of soybean root meristematic cells treated with chilling stress and after recovery. *Protoplasma* 235(1-4): 77-89.
- Suttle, J. C. (1988). Effect of Ethylene Treatment on Polar IAA Transport, Net IAA Uptake and Specific Binding of N-1-Naphthylphthalamic Acid in Tissues and Microsomes Isolated from Etiolated Pea Epicotyls. *Plant Physiol* 88(3): 795-799.
- Suzuki, K., Nishiuchi, T., Nakayama, Y., Ito, M. y Shinshi, H. (2006). Elicitor-induced down-regulation of cell cycle-related genes in tobacco cells. *Plant Cell Environ* 29(2): 183-191.
- Suzuki, T., Nakajima, S., Inagaki, S., Hirano-Nakakita, M., Matsuoka, K., Demura, T., Fukuda, H., Morikami, A. y Nakamura, K. (2005). TONSOKU is expressed in S phase of the cell cycle and its defect delays cell cycle progression in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 46: 736-742.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. y Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev* 15(20): 2648-2653.
- Taoka, K., Kaya, H., Nakayama, T., Araki, T., Meshi, T. y Iwabuchi, M. (1999). Identification of three kinds of mutually related composite elements conferring S phase-specific transcriptional activation. *Plant J* 18(6): 611-623.
- Teale, W. D., Paponov, I. A. y Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(11): 847-859.
- Terasaka, K., Blakeslee, J. J., Titapiwatanakun, B., Peer, W. A., Bandyopadhyay, A., Makam, S. N., Lee, O. R., Richards, E. L., Murphy, A. S., Sato, F. y Yazaki, K. (2005). PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell* 17(11): 2922-2939.
- Testillano, P. S., González-Melendi, P., Ahmadian, P. y Risueño, M. C. (1995). The methylation-acetylation method: an ultrastructural cytochemistry for nucleic acids compatible with immunogold studies. *J. Struct. Biol* 114: 0123-0139
- Testillano, P. S., Sanchez-Pina, M. A., Olmedilla, A., Ollacarizqueta, M. A., Tandler, C. J. y Risueño, M. C. (1991). A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J Histochem Cytochem* 39(10): 1427-1438
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. y Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75(2-3): 291-295.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H. y Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72(3): 443-457.
- Tong, C. G., Reichler, S., Blumenthal, S., Balk, J., Hsieh, H. L. y Roux, S. J. (1997). Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei. *Plant Physiol* 114(2): 643-652.
- Torres Acosta, J. A., de Almeida Engler, J., Raes, J., Magyar, Z., De Groot, R., Inze, D. y De Veylder, L. (2004). Molecular characterization of Arabidopsis PHO80-like proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. *Cell Mol Life Sci* 61(12): 1485-1497.
- Tsukaya, H. (2006). Mechanism of leaf-shape determination. *Annu Rev Plant Biol* 57: 477-496
- Tuteja, N. y Mahajan, S. (2007). Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant Signal Behav* 2(2): 79-85.

- Ueda, J., Miyamoto, K., Yuda, T., Hoshino, T., Fujii, S., Mukai, C., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Shimazu, T. y Fukui, K. (1999). Growth and development, and auxin polar transport in higher plants under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 space experiment. *J Plant Res* 112(1108): 487-492.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K. y Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50(6): 917-925.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9(11): 1963-1971.
- Ulmasov, T. N., Gulov, M. K., Aliev, K. A., Andrianov, V. M. y Piruzian, E. S. (1990). Nucleotide sequences of the chloroplast psbA and trnH genes from cotton *Gossypium hirsutum*. *Nucleic Acids Res* 18(1): 186.
- Umar, A., Buermeyer, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Liskay, R. M. y Kunkel, T. A. (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87(1): 65-73.
- Umeda, M., Bhalerao, R. P., Schell, J., Uchimiya, H. y Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 5021-5026.
- Umeda, M., Shimotohno, A. y Yamaguchi, M. (2005). Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant Cell Physiol* 46(9): 1437-1442.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyne, A., Ferreira, P. C., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J. D., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J. C., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M., De Veylder, L., Van Onckelen, H., Inze, D., Witters, E. y De Jaeger, G. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* 6: 397.
- van Loon, J. J., Folgering, E. H., Bouten, C. V. y Smit, T. H. (2004). Centrifuges and inertial shear forces. *J Gravit Physiol* 11(1): 29-38.
- van Loon, J. J. W. A. (2007). Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Adv Space Res* 39: 1161-1165.
- van Loon, J. J. W. A., Tranck, E., van Nieuwerburgh, F., Snoeckx, L. H. E. H., de Jong, H. A. A. y Wubbels, R. J. (2005). A brief overview of animal hypergravity studies. *J Gravit Physiol* 12: 5-10.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S. y Inze, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14(4): 903-916.
- Vartanian, N., Marcotte, L. y Giraudat, J. (1994). Drought Rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana* (Differential Responses of Hormonal Mutants). *Plant Physiol* 104(2): 761-767.
- Vashisth, A. y Nagarajan, S. (2008). Exposure of seeds to static magnetic field enhances germination and early growth characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Bioelectromagnetics* 7: 571-578.
- Visanji, J. M., Thompson, D. G. y Padfield, P. J. (2006). Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett* 237(1): 130-136.
- Walker, J. D., Oppenheimer, D. G., Conciencia, J. y Larkin, J. C. (2000). SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in *Arabidopsis thaliana* trichomes. *Development* 127(18): 3931-3940.

- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., DePamphilis, C. W. y Ma, H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* 135(2): 1084-1099.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A. J., Crosby, W. L. y Fowke, L. C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* 15(4): 501-510.
- Wang, H., Zheng, H. Q., Sha, W., Zeng, R. y Xia, Q. C. (2006). A proteomic approach to analysing responses of Arabidopsis thaliana callus cells to clinostat rotation. *J Exp Bot* 57(4): 827-835.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S. y Fowke, L. C. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J* 24(5): 613-623.
- Weijers, D., Schlereth, A., Ehrismann, J. S., Schwank, G., Kientz, M. y Jurgens, G. (2006). Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryogenesis. *Dev Cell* 10(2): 265-270.
- Weingartner, M., Criqui, M. C., Meszaros, T., Binarova, P., Schmit, A. C., Helfer, A., Derevier, A., Erhardt, M., Bogre, L. y Genschik, P. (2004). Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* 16(3): 643-657.
- Weingartner, M., Pelayo, H. R., Binarova, P., Zwerger, K., Melikant, B., de la Torre, C., Heberle-Bors, E. y Bogre, L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J Cell Sci* 116(Pt 3): 487-498.
- Wheeler, R. M. (2010). Plants for human life support in space: from myers to mars. *Gravitat Space Biol* 23: 25-35.
- Woodward, A. W. y Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95(5): 707-735.
- Yabuuchi, H., Yamada, Y., Uchida, T., Sunathvanichkul, T., Nakagawa, T. y Masukata, H. (2006). Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication origins. *EMBO J* 25(19): 4663-4674.
- Young, L. M., Evans, M. L. y Hertel, R. (1990). Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of Zea mays. *Plant Physiol* 92: 792-796.
- Young, L. S., Harrison, B. R., Narayana Murthy, U. M., Moffatt, B. A., Gilroy, S. y Masson, P. H. (2006). Adenosine kinase modulates root gravitropism and cap morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142(2): 564-573.
- Zhiponova, M. K., Pettko-Szandtner, A., Stelkovics, E., Neer, Z., Bottka, S., Krenacs, T., Dudits, D., Feher, A. y Szilak, L. (2006). Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (Medsa;CDKB2;1) is activated by wounding and ethylene in a non-cell division-dependent manner. *Plant Physiol* 140(2): 693-703.