

Tesis Doctoral

Rol biológico de la o-glicoproteína AGP21 para el programa de desarrollo de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*

Gloazzo Dorosz, Javier Anselmo

2017-07-12

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gloazzo Dorosz, Javier Anselmo. (2017-07-12). Rol biológico de la o-glicoproteína AGP21 para el programa de desarrollo de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gloazzo Dorosz, Javier Anselmo. "Rol biológico de la o-glicoproteína AGP21 para el programa de desarrollo de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-07-12.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol biológico de la *O*-glicoproteína AGP21 para el programa de desarrollo de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: Ciencias Biológicas
Dpto. FBMC FCEN-UBA

Javier Anselmo Gloazzo Dorosz

Director de Tesis: José Manuel Estévez
Consejero de Estudios: Norberto Daniel Iusem

Lugares de trabajo:

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires
(IIBBA-CONICET), Fundación Instituto Leloir.

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(IFIByNE-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, UBA.

Buenos Aires, 2017

Rol biológico de la *O*-glicoproteína AGP21 para el programa de desarrollo de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*

RESUMEN

Los arabinogalactanos asociados a proteínas (AGPs) son *O*-glicoproteínas localizadas en las paredes celulares que se expresan ampliamente en todas las especies del Reino Vegetal, desde las algas verdes hasta las plantas vasculares. Los AGPs pertenecen a la superfamilia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), que son postraduccionalmente modificadas de dos maneras, los residuos de prolina se convierten en hidroxiprolina por hidroxilación enzimática, y luego la hidroxiprolina es *O*-glicosilada con arabinogalactano (AG). Los AGPs contienen un péptido señal en el extremo amino terminal, y la mayoría de ellos están unidos a la membrana plasmática a través de un anclaje de tipo glicosilfosfatidil-inositol (GPI) codificado en el extremo carboxilo terminal. En *Arabidopsis thaliana*, se han descrito 42 genes que codifican para diferentes tipos de AGP que se clasifican como AGP clásicos cuando el péptido maduro incluye sólo el dominio *O*-glicosilado. Un sub-tipo de AGPs clásicos son denominados AG-péptidos, en los que el *O*-arabinogalactano (AG) es unido a un péptido de sólo 10 a 13 aminoácidos de longitud, que determina la función de la proteína madura. En ese caso, el péptido actúa como una proteína de andamiaje para exponer su AG en la superficie de la célula.

En este trabajo se estudió el rol biológico del AG-péptido 21 (AGP21) de *Arabidopsis thaliana* en el programa de desarrollo de las raíces. El AGP21 se determinó como un gen altamente expresado en las células epidérmicas de la raíz y, a su vez, la falta de los transcritos que en las plantas mutantes *agp21* produce una alteración en el programa de desarrollo del pelo radical y en la expansión en la célula epidérmica. Además, se demostró que la expresión de AGP21 está regulada directamente por el factor de transcripción BZR1 de la vía Brasinoesteroide (BR). Los fenotipos asociados con la interrupción de la vía de señalización BR son similares a los encontrados en el mutante *agp21* y en las raíces bloqueadas con el reactivo específico que se une a AGPs llamado beta-glucosil-yariv. En estos casos, se observó un patrón de expresión anómalo en las células epidérmicas, los factores de transcripción que determinan la diferenciación del pelo radical, tales como GL2 (Glabra 2), RHD6 (*Root Hair Defective6*) y RSL4 (*Root Hair Defective6-like 4*). En base a los resultados obtenidos, se sugiere que AGP21 estaría actuando al menos parcialmente en la vía de señalización BR para la diferenciación celular de los pelos radicales, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

PALABRA CLAVES:

ARABINO GALACTANO PROTEÍNA, PELO RADICAL, EXPANSIÓN CELULAR.

Biological role of the *O*-glycoprotein AGP21 for root development program in the model plant *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

The arabinogalactan proteins (AGPs) are *O*-glycoproteins located in cell walls and widely express in all species of Plant Kingdom, from green algae to vascular plants. AGPs belong to hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGP) superfamily, which are post-translationally modified in two ways, proline residues are converted to hydroxyproline by enzymatic hydroxylation, and then *O*-glycosylated on Hyp with arabinogalactan (AG). AGPs contain a signal peptide at the N-terminus, and most of them are bound to the plasma membrane through a glycosylphosphatidylinositol-type anchor (GPI) encoded at the C-terminus. In *Arabidopsis thaliana*, have been described 42 genes encoding for different AGP types. Classical AGPs are defined as glycoproteins in which mature peptide includes only the *O*-glycosylated domain. A subtype of classical AGPs called AG-peptides, in which the *O*-arabinogalactan (AG) bound to a peptide of only 10 to 13 amino acids in length, determine the function of the mature protein. In that case, the peptide acts as a scaffold protein to expose their AG glycan on the cell surface.

In this work the biological role of the *Arabidopsis thaliana* AG-peptide 21 (AGP21) in root development program was studied. In detail AGP21 was determined as a highly expressed gene in the root epidermal cells, and in turn, the lack of AGP21 transcripts in *agp21* mutant plants produces an alteration in development program of root hair and cell expansion in epidermis. In addition, it was demonstrate that the AGP21 expression is directly regulated by the transcription factor BZR1 of Brassinosteroid (BR) pathway. Phenotypes associated with disruption of the BR signaling pathway are similar to those found in the *agp21* mutant roots, and in those roots blocked with a specific reagent that binds to AGPs called beta-Glucosyl-Yariv. In these cases, the expression of the transcription factors GL2 (Glabra 2), RHD6 (Root hair defective 6) and RSL4 (Root hair defective six-like 4) that determine root hair differentiation was observed with an anomalous expression pattern in epidermal cells. Based on the results obtained, we suggest that AGP21 would be acting at least partially in the BR signaling pathway for epidermal cellular differentiation of root hairs in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

KEY WORDS:

ARABINO GALACTAN PROTEIN, ROOT HAIR, CELL EXPANSSION.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros del laboratorio Juan David, Cecilia, Silvina Paola, Eliana, Silvina, Luciana, Martin; y los ex-compañeros Melina, Martiniano, Rodrigo, Cecilia; les agradezco por haber compartido tantos momentos de aprendizaje, trabajo y amistad.

A José Estévez por haber sido mi Director de Tesis y haberme presentado a la beca CONICET.

A Norberto Iusem por haberme presentado a la Beca UBA y ser mi Consejero de Estudios en el Doctorado.

A los miembros de mi Comité de Seguimiento de Tesis: Gabriela Amodeo, Pablo Cerdán y Santiago Mora García, por sus correcciones y consejos.

A Marina Ciancia del Departamento de Química Orgánica de la FCEN-UBA, que sintetizó los reactivos de Yariv.

Hugo Verli y Laercio Pol-Fachin de la Universidade Federal do Río Grande do Sul por su valiosa colaboración para el desarrollo de esta tesis.

A Joaquin Medina y Jesus Alcazar de la Universidad Politécnica de Madrid y del INIA, por haberme permitido realizar una estadía en su laboratorio y ayudarme en el desarrollo de algunos ensayos.

A Georg Seifert de la Universidad de Recursos Naturales y Ciencias de la Vida de Viena, que me permitió realizar una estadía en su laboratorio.

A todos los integrantes del IFIByNE y del departamento de FBMC, por haberme dado un lugar en ese cálido instituto para comenzar mi tesis doctoral.

A los integrantes del Instituto Leloir que nos dieron el lugar para armar un nuevo laboratorio y establecer el grupo de investigación de las Bases Moleculares del Desarrollo Vegetal.

Pero sobre todo, a las personas sensibles que me dieron su amistad y cariño, a ellos les debo los momentos de felicidad que me dieron la fuerza para terminar esta etapa de mi vida.

A José Clemente que tiene una capacidad de trabajo enorme y que solamente es superada por su corazón.

a Helena, por ser mi compañera y guía en la vida

a Juan David, por haber sido mi maestro de la biología molecular

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	1
1.1 LA PARED CELULAR VEGETAL	1
1.2 LA SUPERFAMILIA DE PROTEINAS RICAS EN HIDROXIPROLINA	3
1.3 LA O-GLICOSILACION EN <i>ARABIDOPSIS</i>	4
1.4 LOS ARABINOGLACTANOS ASOCIADOS A PROTEINAS	6
1.5 EL AGP SE ENCUENTRA EN CIANOBACTERIAS, EN ALGAS VERDES Y EN LAS PLANTAS VASCULARES	9
1.6 ELEMENTOS RIO ABAJO DEL ARABINOGLACTANO TIPO II	10
1.7 LA EXPANSIÓN CELULAR EN LAS RAICES	11
1.8 EL DESTINO CELULAR TRICOBlasto/ATRICOBlasto EN LA EPIDERMIS DE LA RAIZ	13
1.9 LA VIA DE SEÑALIZACION DE BRASINOSTEROIDES EN LA RAIZ	16
2. OBJETIVOS E HIPOTESIS	19
3. MATERIALES Y METODOS	20
3.1 MEDICIÓN DE FENOTIPOS DE DIFERENCIACIÓN DE PELO RADICAL Y EXPANSIÓN CELULAR	20
3.1.1 Crecimiento de las plántulas	20
3.1.2 Determinación de los fenotipos de diferenciación de células epidérmicas a pelo radical, expansión y división celular	20
3.2 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS DE PLÁNTULAS	21
3.2.1 Ensayo de bloqueo de AGPs por reactivo de Yariv	21
3.2.2 Ensayo con inhibidores de la actividad de P4Hs	22
3.3 ANÁLISIS IN SILICO DE LOS GENES DE AGPs	22
3.3.1 Niveles de expresión de AGPs en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22

3.4 OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS MUTANTES	23
3.4.1 Extracción de ADN de plantas	23
3.4.2 Identificación de plantas mutantes de T-DNA	23
3.4.3 Obtención de dobles mutantes mediante cruzamientos	24
3.4.4 Extracción de ARN de plantas	25
3.4.5 Análisis de los niveles de transcripto por RT-PCR	25
3.5 GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	25
3.5.1 Clonados del gen AGP21 y vectores utilizados	25
3.5.2 Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>Agrobacterium</i>	27
3.5.3 Expresión transiente en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	27
3.5.4 Identificación de las plantas transgénicas por resistencia y expresión de la fluorescencia	28
3.5.5 Obtención de plantas mutantes transgénicas por cruzamientos	28
3.6 DETERMINACIONES A PARTIR DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS	29
3.6.1 Extracción de proteínas y ensayo de Western Blot	29
3.6.2 Obtención de imágenes por microscopía confocal y determinación de localización celular	29
3.6.3 Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en imágenes de microscopía confocal	29
3.6.4 Capacidad de difusión de proteínas por ensayo de Recuperación de la Fluorescencia luego del Fotoblanqueo (FRAP).	30
3.7 MODELADO POR DINÁMICA MOLECULAR DE AGP21	31
4. RESULTADOS	33
4.1 IMPACTO DEL BLOQUEO DE LOS O-ARABINOGALACTANOS DE AGPs EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	33
4.1.1 El bloqueo de los AGPs promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces	33
4.1.2 El bloqueo de los AGPs inhibe la expansión y la división celular en las raíces	34
4.1.3 La inhibición de la hidroxilación de prolinas promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos, en las raíces	37

4.1.4 La inhibición de la hidroxilación de prolinas inhibe la expansión y la división celular en las raíces	40
4.1.5 Plantas mutantes con deficiente hidroxilación de prolinas presentan mayor diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos	43
4.1.6 El truncado del O-arabinogalactano desencadena la diferenciación a tricoblastos, la inhibición de la expansión y la división celular en las raíces	44
4.2 EL AGP21 ES UN AG PÉPTIDO IMPORTANTE PARA EL DESTINO TRICOBLASTO EN LA RAIZ	47
4.2.1 Los AGPs son expresados en diferentes etapas del desarrollo de la raíz	47
4.2.2 La falta de ciertos AG péptidos promueve la diferenciación de las células epidérmicas a tricoblastos en la raíz	49
4.2.3 Los AG péptidos AGP15 y AGP21 participan del proceso de expansión y división celular en las raíces	51
4.2.4 La proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 se encuentra principalmente en las células epidérmicas que desarrollan pelos radicales	53
4.2.5 El AGP21 regula el destino celular en la epidermis de las raíces	55
4.2.6 La proteína de fusión Venus-AGP21 se expresa de forma ubicua	58
4.2.7 AGP21 estaría O-glicosilado y posiblemente unido a la membrana plasmática	59
4.2.8 El AGP21 se encuentra localizado en la membrana plasmática, posiblemente anclado por GPI	61
4.2.9 La localización de AGP21 en tricoblastos es modificada por el tratamiento con β -Glc-Yariv	63
4.2.10 Capacidad de difusión de Venus-AGP21 por ensayo de la recuperación de la fluorescencia (FRAP)	65
4.2.11 El O-arabinogalactano en el AGP21 promueve su estabilización conformacional	67
4.3 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN POR BRASINOESTEROIDES (BRs)	69
4.3.1 La vía de BR es crucial para el destino celular y la expansión en la epidermis de la raíz en <i>Arabidopsis</i>	68
4.3.2 La expresión de la proteína AGP21 es aumentada por la vía de BR	72

4.4 LOS FACTORES QUE PROMUEVEN EL DESTINO CELULAR TRICOBLASTO SON ACTIVADOS POR EL BLOQUEO DE AGPs	75
4.4.1 Los niveles del factor BZR1 son reducidos por el bloqueo de AGPs	75
4.4.2 El bloqueo de AGPs afectaría la señalización de BR activando BIN2	77
4.4.3 Los factores GL2, RHD6, RSL4 que regulan el destino celular en la epidermis de la raíz, son expresados anormalmente por el bloqueo de los AGPs	79
4.4.4 La localización en tricoblastos del factor RHD6 es promovida por BR	82
5. DISCUSION Y PERSPECTIVAS FUTURAS	83
5.1 EL BLOQUEO DE LOS ARABINOGALACTANOS ALTERAN EL DESTINO CELULAR EN LA RAÍZ DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	83
5.2 LA AUSENCIA DEL PÉPTIDO AGP21 PROMUEVE EL DESTINO TRICOBLASTO	84
5.3 LOS BRASINOESTEROIDES REGULAN LA EXPRESION DE AGP21	86
5.4 LOS FACTORES QUE DEFINEN EL DESTINO CELULAR EN LA EPIDERMIS RADICAL SON AFECTADOS POR EL BLOQUEO DE AGPs	87
6. ANEXOS	91
7. REFERENCIAS	97

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1I. Modelo de pared celular vegetal.	2
Figura 2I. Reacción de hidroxilación de los residuos de prolina por acción enzimática de P4H.	3
Figura 3I. Los tres tipos de AGPs.	5
Figura 4I. Esquema de la familia de glicoproteínas del tipo AGP.	7
Figura 5I. Expansión celular en la epidermis radical de <i>Arabidopsis</i> .	11
Figura 6I. La morfología celular es alterada en la epidermis radical de las plantas <i>reb1-1</i> deficientes del donador de D-galactosa.	13
Figura 7I. El destino celular tricoblasto/atricoblasto en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	14
Figura 8I. Modelo de la regulación conjunta de factores del destino tricoblasto y atricoblasto.	15
Figura 9I. Modelo de la vía de señalización de Brasinoesteroides.	16
Figura 10I. La falta de BRs reprime la expresión del factor GL2 de destino atricoblasto.	17
Figura 11I. Modelo de la regulación por BR de factores del destino tricoblasto y atricoblasto.	18
Figura 1M. Estructura del reactivo β -Glc-Y β -glucosil-Yariv.	21
Figura 2M. PCR para determinar las líneas T-ADN homocigotas mutantes.	24
Figura 1R. El bloqueo de los AGPs promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.	34
Figura 2R. El bloqueo de los AGPs inhibe la expansión y la división celular en las raíces.	36
Figura 3R. La inhibición de la hidroxilación de prolinas por DP, promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.	38
Figura 4R. La inhibición de la hidroxilación de prolinas por EDHB, promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.	39
Figura 5R. La inhibición de la hidroxilación de prolinas por DP, reduce la expansión y la división celular en las raíces.	41
Figura 6R. La inhibición de la hidroxilación de prolinas por EDHB, reduce la expansión y la división celular en las raíces.	42
Figura 7R. Motivo peptídico de un AGP y estructura del O-arabinogalactano tipo II.	44

Figura 8R. Plantas mutantes con deficiente hidroxilación de prolinas y <i>O</i> -glicosilación presentan mayor diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.	45
Figura 9R. Plantas mutantes con deficiente hidroxilación de prolinas y <i>O</i> -glicosilación presentan menor expansión y división celular en las raíces.	46
Figura 10R. El AGP21 se encuentra entre los AG péptidos más expresados en plántulas y que son determinantes en la zona de elongación radical.	48
Figura 11R. Los péptidos AGP21, AGP15 y AGP20 participan en la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.	50
Figura 12R. Los AG péptidos AGP15 y AGP21 participan del proceso de expansión y división celular en las raíces.	52
Figura 13R. La proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 se encuentra principalmente en las células epidérmicas que desarrollan pelos radicales.	54
Figura 14R. El péptido AGP21 es determinante para la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.	56
Figura 15R. El péptido AGP21 participa en la expansión y la división celular en las raíces.	57
Figura 16R. La proteína AGP21 se encuentra ubicuamente en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	58
Figura 17R. AGP21 es una glicoproteína de 100 KDa de peso molecular.	60
Figura 18R. AGP21 se encuentra unido a la membrana plasmática y en el espacio apoplástico.	62
Figura 19R. AGP21 es re-localizado a las células epidérmicas adyacentes por β -Glc-Yariv.	64
Figura 20R. Ensayo de recuperación de la fluorescencia (FRAP) de Venus-AGP21.	66
Figura 21R. Los O-arabinogalactanos en AGP21 confieren mayor estabilidad conformacional.	68
Figura 22R. Plantas mutantes de la vía de señalización de brasinoesteroides presentan diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos anormal en las raíces.	70
Figura 23R. Plantas mutantes de la vía de señalización de brasinoesteroides presentan expansión y división celular anormales en las raíces.	71
Figura 24R. AGP21 responde a la presencia de la hormona brasinoesteroide.	73
Figura 25R. La vía de señalización de brasinoesteroide modula la expresión del gen AGP21.	74
Figura 26R. El bloqueo de los AGPs produce la inhibición de la expresión del factor BZR1.	76
Figura 27R. Plantas mutantes de la kinasa BIN2 presentan diferenciación anormal de las células epidérmicas en las raíces y son insensibles al bloqueo de los AGPs.	78

Figura 28R. El bloqueo de los AGPs produce una distribución anormal de los factores de transcripción de diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos.	80
Figura 29R. La expresión del factor de transcripción RHD6 es mayor al bloquear los AGPs, y es limitada por la activación de la vía de brasinoesteroides.	82
Figura 1D. Modelo de diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos.	90

TABLAS

Tabla 1M. Líneas de T-ADN mutantes generadas en esta tesis.	24
Tabla 2M. Vectores utilizados para las construcciones de los clonados de AGP21.	27
Tabla 3M. Lista de genes, plantas mutantes y plantas transgénicas utilizadas.	32
Tabla 1R. IC ₅₀ obtenidas para cada fenotipo analizado.	40
Tabla 1A. Reactividad del β -Glc-Y con (1 \rightarrow 3) β -galactanos del tipo AGP.	91
Tabla 2A. Promedio de ángulos ζ durante las simulaciones de dinámica molecular.	91
Tabla 3A. Regulación de AGPs por la vía de Brasinoesteroide y los factores ARF6 y PIF4.	92
Tabla 4A. Los factores ARF6, BZR1 y PIF4 se unen al promotor del gen AGP21.	93
Tabla 5A. AGPs regulados por el factor de transcripción de la vía de Brasinoesteroides, BZR1.	93
Tabla 6A. Primers utilizados en esta Tesis.	94
Tabla 7A. Secuencia clonada de la proteína de fusión Venus-AGP21.	95
Tabla 8A Secuencia clonada de la región promotora del gen que codifica para AGP21.	96

ABREVIATURAS MAS UTILIZADAS

HG: Homogalacturonano
RGI: Rhamnogalacturonano I
RGII: Rhamnogalacturonano II
CESA: Celulosa-sintasa
HRGP: Glicoproteínas Ricas en Hidroxiprolina
AGP: Arabinogalactano asociado a proteína
AG: Arabinogalactano
 β -Glc-Y: beta-glucosil-Yariv
 α -Man-Y: alfa-manosil-Yariv
EXT: Extensina
Hyp: Hidroxiprolina
P4H: Prolil-4-Hidroxilasa
EDBH: Ethyl-3,4-Dihydrobenzoate
DP: α - α Dipyridyl
GT: Glicosil-Transferasa
AraT: Arabinosil-Transferasa
GalT: Galactosil-Transferasa
GALT29A: (1 \rightarrow 6) β -galactosil-transferasa 29A
RAY: arabinosil-transferasa *Reduced Arabinose Yariv1*
ZE: Zona de elongación de la raíz
ZM: Zona meristemática de la raíz
GPI: ancla de glicosilfosfatidilinositol
FRAP: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*
ROI: Región de interés
BR: Brasinoesteroide
BIN2: *Brassinosteroid Insensitive2*
BZR1: *Brassinazole resistant1*
WT: *Wild Type*

1. INTRODUCCION

1.1 LA PARED CELULAR VEGETAL

A lo largo de todo el crecimiento las plantas absorben grandes cantidades de agua, la cual genera una presión de turgencia interna contenida por las paredes celulares. Este proceso genera un esqueleto hidroestático que tiene la función de proveer un sostén mecánico para la planta. La pared celular vegetal está compuesta mayoritariamente por polisacáridos del tipo de celulosa, hemicelulosa y pectinas, y adicionalmente están presentes las glicoproteínas. Las glicoproteínas más abundantes en la pared celular vegetal pertenecen al tipo de proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs). En las plantas vasculares, la estructura predominante de la pared celular son las microfibrillas de celulosa que son entrecruzadas por los xiloglucanos y junto a las pectinas, constituyen una red de polisacáridos que envuelven a las células (Dick-Perez et al., 2011).

La celulosa se encuentra en forma de fibrillas largas no ramificadas, compuestas aproximadamente por 30-36 cadenas de (1→4) β-D-glucosa que se mantienen unidas entre sí por puentes de hidrógeno. El largo de las fibrillas no es conocido, pero se han observado cadenas con hasta 14.000 unidades de glucosa, lo que correspondería a una fibrilla de alrededor de 7 μm de largo. Las hemicelulosas son polisacáridos ramificados con esqueletos de azúcares neutros que pueden formar puentes de hidrógeno con las fibrillas de celulosa, como también con el resto de los polisacáridos en la pared (Kerr & Fry, 2003). Las fibrillas de celulosa, que son sintetizadas en la membrana plasmática por grandes complejos tipo roseta de Celulosa-sintasa (CESA), son insolubles debido a que las cadenas de glicanos se agregan lateralmente mediante uniones puente de hidrógeno y fuerzas de *Van der Waals*, lo que produce estructuras cristalinas de cadenas paralelas. Se piensa que la unión de la hemicelulosa a la superficie de las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno sería un mecanismo importante para el ensamblado de la estructura de la pared celular (Somerville et al., 2004) (**Figura 1I**).

Las pectinas están definidas por la presencia de ácidos urónicos como su principal componente. La pectina más simple es el homogalacturonano (HG), un polímero no ramificado de (1→4) α-D-ácido galacturónico. El rhamnogalacturonano I (RGI) tiene una cadena principal compuesta por unidades alternadas de (1→2) α-L-rhamnosa y (1→4) α-D-ácido galacturónico, con decoraciones de cadenas laterales de L-arabinanos, D-galactanos y D-xilanos. El rhamnogalacturonano II (RGII) está formado solo por una cadena principal de (1→4) α-D-ácido galacturónico, que puede ser muy ramificado. Ha sido sugerido que RGI funcionaría como andamiaje para las otras pectinas, como el RGII, mientras que el HG se uniría covalentemente como cadenas laterales (Vincken et al., 2003). El HG está unido entre sí por puentes de Ca²⁺ entre los grupos carboxilo de las cadenas, y en el RGII entre los ésteres de apiosil-borato. Estos dos tipos de modificaciones son ejemplos de modificaciones *in muro*, que cumplen la función de reforzar la pared celular por la generación de una red de pectinas entrecruzadas.

Los principales grupos de organismos fotosintéticos (cianobacterias, algas y las plantas terrestres) tienen paredes celulares. Se ha propuesto que hace 1,5 mil millones de años, antes de que las plantas se establecieran en la tierra y llegaran a diversificarse, tuvo lugar el origen evolutivo de los organismos eucariotas capaces de fotosíntesis oxigénica, a partir de un caso de endosimbiosis primaria. La pluricelularidad de plantas terrestres y de macroalgas ha evolucionado con mecanismos distintivos para los agrupamientos de células incluyendo la expansión celular y la citocinesis. Se ha demostrado que los arabinogalactanos asociados a proteínas (AGPs) no son específicos para las plantas terrestres, sino que están presentes también en las algas verdes como *Oedogonium bharuchae* (Estevez JM, et al., 2008) y *Codium fragile* (Estevez JM, et al., 2009), así como en las algas pardas, que es un linaje de organismos fotosintéticos filogenéticamente separados de las plantas terrestres (Herve et al., 2016).

Los AGPs se encuentran en la superficie de las células, en las membranas plasmáticas, en las paredes celulares y en secreciones celulares. Los AGPs son proteoglicanos compuestos por arabinogalactanos (AGs) con (1→3) β-D-galactanos con ramificaciones de (1→6) β-D-galactano decoradas con arabinosa, ácido glucurónico y otros azúcares. Los AGs pueden representar hasta el 90% de una molécula de AGP (Ellis et al., 2010), siendo los péptidos AGPs con sólo 10 a 15 residuos de aminoácidos los más pequeños. Los AGPs pertenecen al grupo de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (del inglés: *Hydroxyproline Rich Glycoproteins*-HRGPs) (Showalter, 2001; Tan L, et al., 2012).

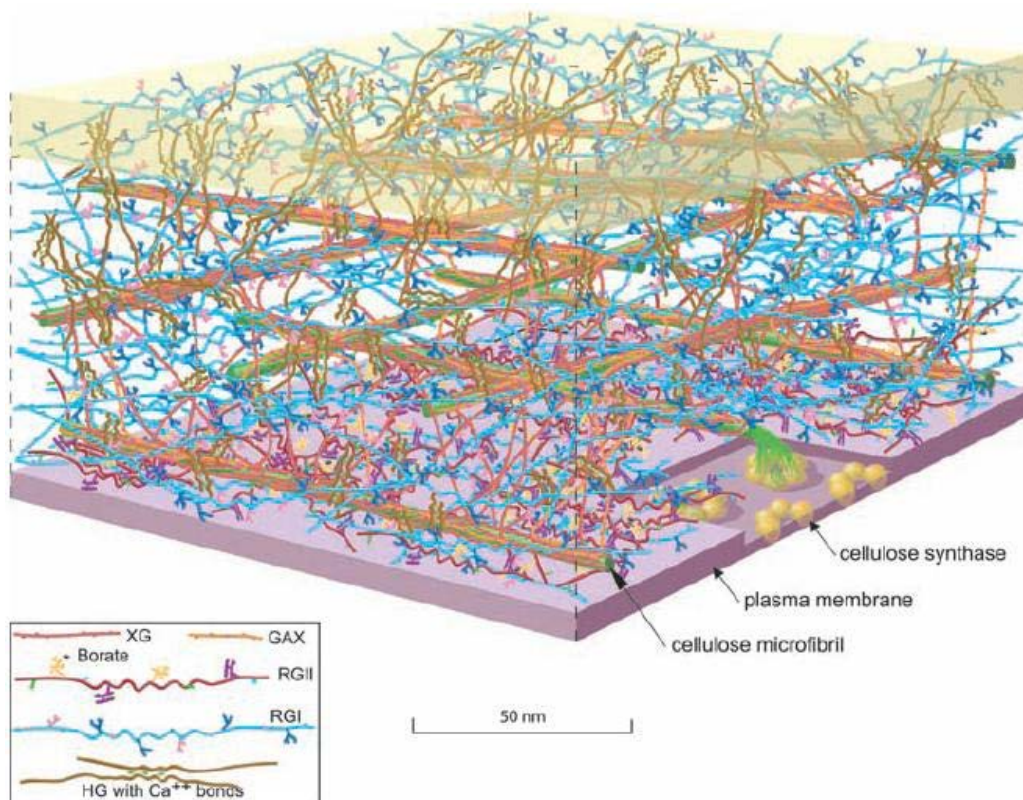


Figura 1I. Modelo de pared celular vegetal.

Se representan las microfibrillas de celulosa (verde), las pectinas (violeta y azul) y xiloglucanos (rojo) (Somerville et al., 2004).

1.2 LA SUPERFAMILIA DE PROTEINAS RICAS EN HIDROXIPROLINA

Las secuencias de las HRGPs son ricas en hidroxiprolina/prolina, alanina y serina/treonina y la disposición de las prolinas parece dirigir la clase de *O*-glicano que será unido al péptido (Tan L, et al., 2012). Se estima que para las plantas en general las Proteínas Ricas en Hidroxiprolina (HRGPs) forman hasta un 10% (en peso seco) de la pared celular vegetal. La modificación pos-traducciona más común en las HRGPs es la hidroxilación de los residuos de prolina (Pro) en 4-hidroxiprolina (Hyp) por la actividad enzimática de Prolil 4-hidroxilasas (P4Hs). La conversión de los residuos de Pro en Hyp en péptidos de la vía secretoria modifica la conformación proteica y provee de grupos hidroxilos reactivos como sustratos de modificaciones posteriores como la *O*-glicosilación (**Figura 2I**). Existen dos familias de P4Hs que presentan actividad enzimática para ciertos motivos peptídicos específicos. Las P4Hs del colágeno (C-P4Hs) catalizan la hidroxilación de los residuos Pro en la posición Y del motivo Gly-X-Y, que es el motivo característico del colágeno y proteínas tipo colágeno. Por otra parte, las P4Hs asociadas al factor de transcripción inducible por hipoxia (*Hypoxia-inducible transcription factor* HIF) que catalizan la hidroxilación de dos residuos Pro ubicados en las posiciones 564 y 404 en HIF1- α (Bruick&McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Ivan et al., 2002; Myllyharju, 2003, 2008).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* presenta 13 posibles P4Hs (Hieta&Myllyharju, 2002), AtP4H-1 y AtP4H-2 han sido parcialmente caracterizadas *in vitro* (Hieta&Myllyharju, 2002; Tiainen et al., 2005) pero no *in vivo*. Las AtP4H-2, AtP4H-5 y AtP4H-13 se distinguieron como determinantes para la expansión del pelo radical, asociadas a la preferente hidroxilación de EXTs (Velasquez SM, et al., 2015). Las P4Hs son dioxigenasas ya que introducen un átomo de oxígeno entre el H-4 y C-4 de las unidades de peptidil-prolina y necesitan como co-sustratos al 2-oxoglutarato, al O₂ y al Fe (II) junto con ascorbato como co-factores. De los 4 posibles isómeros de hidroxiprolina, el más común en la naturaleza es la (2S,4R)-4-hidroxiprolina (*trans*-4-hidroxiprolina), haciendo referencia a la relación *trans* entre los sustituyentes -COOH y -OH en el anillo pirrolidina (Hieta&Myllyharju, 2002; Myllyharju, 2003). El isómero *cis*-4-hidroxiprolina ha sido reportado como parte de los péptidos cíclicos tóxicos del hongo Amanita (ej: α -amanitafaloidina) (Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. 1996).

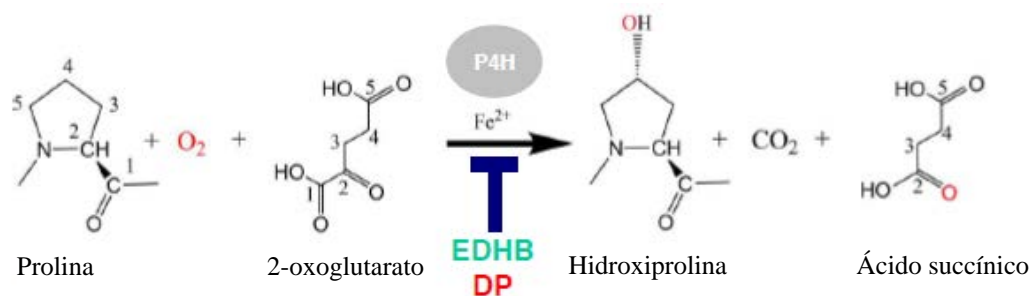


Figura 2I. Reacción de hidroxilación de los residuos de prolina por acción enzimática de P4H.

Se representa la inhibición de la actividad P4H por el inhibidor competitivo *etil-3,4-dihidroxi benceno* (EDHB) por el sitio de unión de 2-oxoglutarato a P4H; y la inhibición de α,α -dipiridil (DP) el cual es un quelante del co-factor Fe (²⁺).

1.3 LA O-GLICOSILACION EN ARABIDOPSIS

La clase de glicanos unidos a los residuos de Hyp en el esqueleto de la proteína depende de si los residuos de Hyp son contiguos o no contiguos (Zhao ZD, et al., 2002). La hipótesis de contigüidad para las Hyp (Kieliszewski MJ, et al., 1994) establece que los residuos contiguos de Hyp en el motivo Ser-Hyp-Hyp-Hyp que se encuentra típicamente en las Extensinas (EXT), son sitios de unión para arabino-oligosacáridos cortos. En cambio, si los residuos de Hyp son no-contiguos como en el motivo Ala-Hyp-Ala-Hyp-Ser-Hyp que se encuentran en los arabinogalactanos asociados a proteínas (AGPs), son los sitios de unión para arabinogalactanos.

Las proteínas que atraviesan la vía secretoria celular pueden ser glicosiladas en el Aparato de Golgi si incluyen señales de glicosilación. A diferencia de la *N*-glicosilación que ocurre en un paso por transposición del *N*-glicano completo al péptido, en la *O*-glicosilación el *O*-glicano se va generando sobre el péptido directamente, en varios pasos catalizados por enzimas glicosiltransferasas específicas para cada tipo de unión glicosídica. Es muy probable que muchas glicosiltransferasas diferentes (GTs) participen en la glicosilación (Johnson KL, et al., 2003 b; Wilson IB, et al., 2002). Aún no ha sido totalmente esclarecido si la adición de los *O*-arabinogalactanos a AGPs se produce por un residuo a la vez, o si se añade un núcleo de glicanos en bloque como es el caso de la *N*-glicosilación (Di Cola et al., 2005; Lederkremer, 2009; Liu & Howell, 2010).

La *O*-glicosilación puede realizarse en los residuos de Serina (Ser), Treonina (Thr) o Hidroxiprolina (Hyp), en el contexto de un péptido de la vía secretoria celular. La transferencia del primer azúcar de la cadena *O*-glicosídica en formación es muy específica respecto al aminoácido sustrato, así como al motivo peptídico en el que se encuentra el aminoácido receptor del *O*-glicano. En el caso de la *O*-glicosilación en residuos de Hyp, han sido identificadas dos estructuras predominantes para los glicanos de HRGPs: arabinanos en las Extensinas y arabinogalactanos en AGPs (**Figura 3I**).

En los AGPs el glicano que es unido inicialmente a un residuo de Hyp es una D-Galactosa mediante una unión en el carbono 4 de la Hyp resultando Hyp-(1→4) β-Gal. La identificación de la enzima responsable de la catálisis del primer paso en la *O*-glicosilación de AGPs en *Arabidopsis thaliana*, permitió evaluar su importancia para el desarrollo de diversos órganos vegetales. Las plantas mutantes para un único gen de la Galactosil-Transferasa que presentaron la pérdida de la actividad catalítica Hidroxiprolil-galactosil-Transferasa (HPTG) no presentaron fenotipos evidentes. En cambio, en las plantas triple mutante *hpgt1,hpgt2,hpgt3*; se observaron raíces laterales más largas, pelos radicales más largos y densos, raíces hinchadas, hojas más pequeñas y pecíolos más cortos (Ogawa-Ohnishi M & Matsubayashi Y, 2015). De manera consistente con la especificidad de la *O*-galactosilación para AGP, la mutante *hpgt1,hpgt2,hpgt3* resultó menos sensible a los efectos inhibitorios para el crecimiento vegetal producidos por el reactivo de Yariv en raíz y tubo polínico, respecto al *Wild Type* (WT) (Allan M. Showalter & Debarati Basu, 2016).

Las enzimas HPGTs identificadas en *Arabidopsis* pertenecen a la familia de glicosil-transferasas CAZy (*Carbohydrate Active Enzyme database*) GT31, que incluye a su vez a la enzima Galactosil-Transferasa2 (Gal-T2) cuya actividad Hidroxiprolil-galactosil-Transferasa había sido previamente reportada (Ogawa-Ohnishi M.&Matsubayashi Y., 2015). La actividad HPGT *in vitro* fue determinada utilizando el motivo mínimo en que debiera tener lugar la *O*-galactosilación, el cual fue un péptido de sólo 11 aminoácidos correspondiente al AGP14, uno de los AG péptidos más pequeños de *Arabidopsis*. Se pudo comprobar al incubar diferentes variantes del motivo de AGP14 con el donador de azúcar UDP-D-Gal y junto a microsomas de células T-87 de *Arabidopsis*, que el sustrato mínimo que pudo reconocer la enzima HPTG es la secuencia: Ala-Hyp-Ala-Hyp-Ser-Hyp-Thr-Ser (AOAOSOTS) (Allan M. Showalter & Debarati Basu, 2016).

La galactosilación específica para la síntesis de arabinogalactanos del tipo II ha sido asociada a la (1→6) β-galactosil-transferasa 29A (AT1G08280) de *Arabidopsis* perteneciente a la familia GT29 CAZy, responsable de la unión (1→6) β-galactosilo en las cadenas de (1→3) β-galactooligosacáridos presentes en los AGPs. Ha sido demostrada *in vitro* su actividad (1→6) β-galactosil-transferasa, y las plantas mutantes del gen que codifica para la GALT29A (*gt29-1*) contienen niveles reducidos de AGPs tipo II (Dilokpimol et al., 2014). A su vez, fue identificado el gen *Reduced Arabinose Yariv1* (AT1G70630) que codifica para una posible arabinosil-transferasa de *Arabidopsis* perteneciente a la familia GT77 CAZy, cuya planta mutante T-ADN (*ray1*) presenta niveles reducidos de AGP-arabinosilado en el conjunto de los AGPs totales precipitados con β-Glc-Y (Gille et al., 2013).

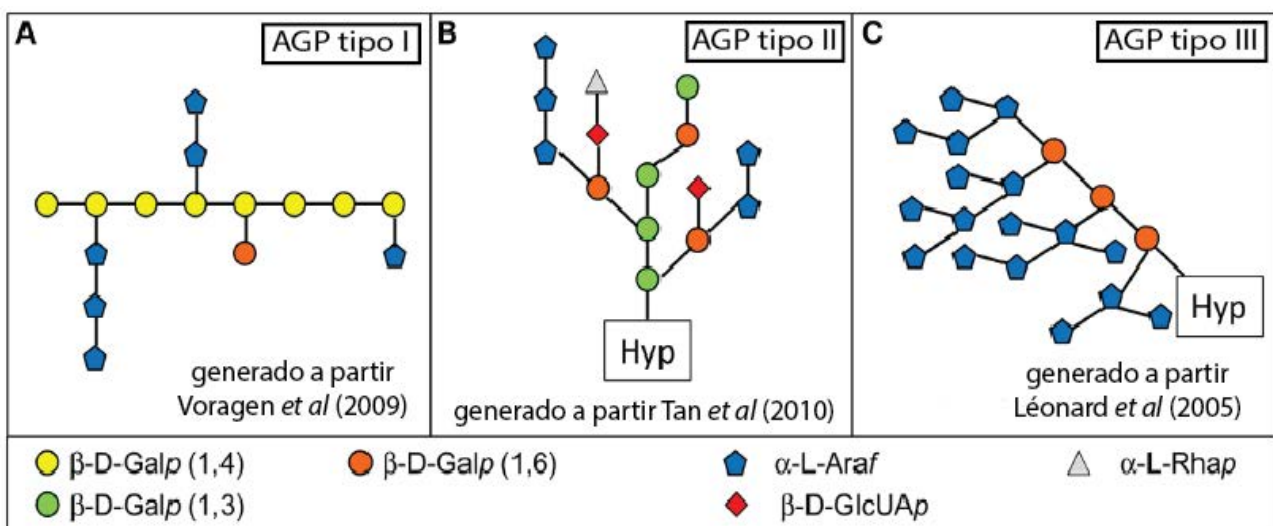


Figura 3I. Los tres tipos de AGPs.

Una de las principales diferencias entre estos tipos de AGP es el tipo de uniones entre los residuos galactopiranososa (Galp) de la cadena principal: A) β-1,4 en los AGP tipo I; B) β-1,3 y β-1,6 en los AGP tipo II, y C) β-1,6 en los tipo III (Hijazi et al., 2014).

1.4 LOS ARABINOGALACTANOS ASOCIADOS A PROTEINAS

El AGP se puede caracterizar como clásico o no clásico según si incluye un gran dominio del tipo AGP y una señal de anclaje de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) que le confiere unión a la membrana. Una característica de las formas no-clásicas de AGPs es que a menudo son componentes de estructuras quiméricas, en las que los dominios de AGP (con *O*-glicanos unidos) están presentes junto a otros dominios proteicos, por ejemplo dominios del tipo Fasciclina. Esto ha llevado a la idea de que un componente de AGP en el contexto de una proteína con otros dominios adicionales podría modular su función en la pared celular (Majewska-Sawka A & Nothnagel EA, 2000). Los AGPs participan en la expansión celular, deposición de la pared celular, la embriogénesis, la remodelación de los tejidos, la respuesta de defensa de las plantas (Seifert y Roberts, 2007). Sin embargo, a pesar de la evidencia convincente de que los AGPs están implicados en tales procesos, la comprensión bioquímica de la acción de cada AGP no ha sido aún alcanzada.

Existen una familia de moléculas que se ha observado que reaccionan específicamente con AGs, conformados por fenil-glicósidos sintéticos diseñados originalmente para provocar anticuerpos de hidratos de carbono, denominados reactivos de Yariv (**Figura 1M**). Posteriormente se encontró que los reactivos de Yariv pueden unirse selectivamente y precipitar AGPs a partir de materiales vegetales (Yariv et al., 1967).

Los AGPs son glicoproteínas presentes en las membranas celulares y en la matriz extracelular de las plantas, que participan en diversas funciones para el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la señalización, embriogénesis, y la muerte celular programada (Gaspar YM, 2001; Majewska-Sawka A & Nothnagel EA, 2000; Showalter AM, 2001). Ellos comprenden una gran familia de genes en *Arabidopsis thaliana* con casi 50 miembros, incluidos las Fasciclinas (FLAs) que además del dominio AGP incluyen un dominio Fasciclina de asociación proteica (Schultz CJ, 2002). Existen además AGPs quiméricos que contienen dominios putativos de adhesión, además de los dominios de AGP (Johnson KL, et al., 2003, a y b).

En *Arabidopsis* hay doce AGPs que pertenecen a un subgrupo conocido como AG-péptidos. Sus proteínas codificadas tienen las características de los AGPs clásicos, como una señal de secreción N-terminal, un dominio central rico en Pro/Hyp, Ser, Thr, y Ala, y una región C-terminal que codifica para la adición de un anclaje del tipo glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (Du, H., Clarke, 1996). Luego de la *O*-glicosilación el péptido es clivado en un aminoácido denominado sitio omega, en el cual es unido el ancla de GPI (Schultz et al., 2004). La característica distintiva de los AG-péptidos es que el motivo central rico en Prolinas representa todo el esqueleto peptídico de la proteína madura, el cual consiste solamente en 10 a 13 residuos de aminoácidos (Schultz, C. J. 2000) (**Figura 4I**).

Los AGPs contienen grandes polisacáridos del tipo de arabinogalactano (AG) *O*-ligados a los residuos de hidroxiprolina en el esqueleto de la proteína (Gaspar YM, 2001; Majewska-Sawka A & Nothnagel EA, et al., 2000; Showalter AM 2001). La modificación de los residuos de prolina en la proteína se cree que ocurre co-traduccionalmente en el retículo endoplasmático (ER) (Gaspar YM, 2001; Velasquez SM, et al., 2015), actuando directamente al reconocer una secuencia rica en prolina.

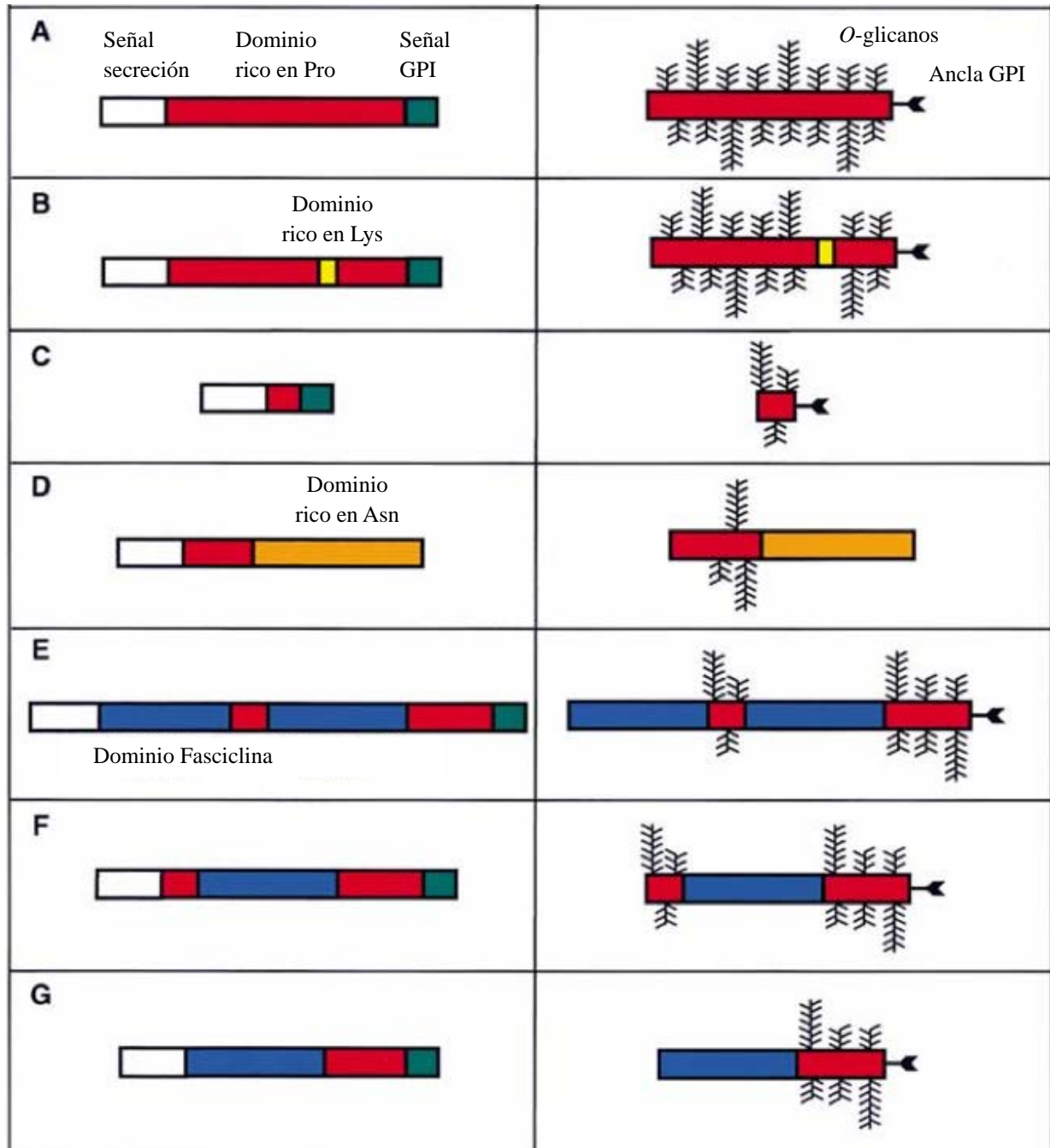


Figura 4I. Esquema de la familia de glicoproteínas del tipo AGP.

Se indica la señal de secreción (blanco), el dominio rico en prolina (rojo), la señal del ancla de GPI (verde), el dominio rico en lisina (amarillo), el dominio rico en asparagina (naranja) y el dominio de Fasciclina (azul). Adaptado de Gaspar, et al., 2001.

Existen varios antecedentes en los que se ha demostrado la interacción y/o unión de AGPs con una amplia variedad de sustratos, incluyendo pectinas (Yamada, H. 2000; Serpe, M. D., 1994), y receptores del tipo kinasas (Gens, J. S., 2000). La especificidad de interacción que proveen los hidratos de carbono es importante para la función de los proteoglicanos en animales, como se comprobó con los heparán-sulfatos a partir de fibroblastos que se unen específicamente al factor de crecimiento de fibroblastos básico, facilitando de ese modo su endocitosis en las células luego de la unión a los receptores (Chai L & Morris, 1999).

Los anticuerpos monoclonales son potentes herramientas bioquímicas para localizar polisacáridos del tipo AGP por inmuno-tinción. Sin embargo, como las estructuras moleculares que reconocen los anticuerpos son en su mayoría desconocidas (Melzer B, et al., 2010) sigue siendo incierto cómo la estructura molecular del AG influye en la localización-función de AGPs individuales. Una mejor comprensión de la estructura y función del AGP-glicano requiere oligosacáridos bien definidos y homogéneos, los cuales pueden ser obtenidos por síntesis química (Huang Y, et al., 2016). Otra estrategia posible para relacionar un arabinogalactano con una función biológica consiste en simplificar el análisis a un AGP en particular para un rol biológico determinado. Como fue observado para el AGP1 de *Cucumis sativus* cumpliendo un rol positivo para la elongación del hipocotilo y que a su vez, al ser sobreexpresado el CsAGP1 en plantas de tabaco se observó un efecto del aumento del crecimiento general en las plantas transformadas (Park MH et al., 2003)

Dada la presencia del gran número de genes que codifican para AGP en *Arabidopsis* es muy posible cierta redundancia respecto a una función biológica, lo que hace complicado asignar un AGP particular como responsable de un rol biológico determinado (Kafri et al., 2009). Los AGP6 y AGP11 de *Arabidopsis* fueron reportados como necesarios para el desarrollo del tubo polínico de forma conjunta (Coimbra et al., 2010). Posteriormente, fue identificado el AGP4 (JAGGER) como la contraparte femenina en el proceso de fecundación. El AGP4 es secretado por las células del pistilo para evitar el crecimiento de múltiples tubos polínicos dentro de un mismo saco embrionario en *Arabidopsis* (Pereira AM, et al., 2016). Ha sido propuesto que los AGPs ejercen una función adhesiva sobre la superficie del estigma, actuando como una base adherente para capturar el polen (Crawford BC et al., 2007; Ge X et al., 2010).

Partiendo de tubos polínicos de *Torenia fournieri* crecidos en sistemas semi-*in vitro*, fue demostrada la existencia de un factor de activación (AMOR) que por difusión simple induce la capacidad de los tubos polínicos para ser atraídos por los péptidos LURE secretados por las células sinérgidas. Dicho factor fue purificado e identificado como un AGP con arabinogalactano tipo II, a partir de su unión al reactivo de β -Glc-Yariv. Sorprendentemente, la mínima fracción del arabinogalactano constituida por: el ácido 4-metil-(1 \rightarrow 6) β -D-galactosa-(1 \rightarrow 6) β -D-galactosa, presentó una actividad similar que el arabinogalactano completo de AMOR (Mizukami AG et al., 2016).

1.5 EL AGP SE ENCUENTRA EN CIANOBACTERIAS, EN ALGAS VERDES Y EN LAS PLANTAS VASCULARES

Los AGPs están ampliamente distribuidos en las plantas vasculares y han sido halladas estructuras de glicano tipo AGP y epítopes de AGs en miembros de las algas verdes (Estevez JM, et al., 2008; Estevez JM, et al., 2009; Sørensen I, et al., 2010; Domozych et al., 2012). La evidencia de AGPs fuera del Clado *Viridiplantae* que abarca las plantas terrestres y las algas verdes fue encontrado en la cianobacteria *Nostoc sp.*, la cual forma filamentos unidos por un mucílago firme (Jackson et al., 2012).

Llamativamente los AGPs también estarían presentes en las algas marrones, en las cuales se han descubierto la presencia de secuencias que codifican para las enzimas prolil-4-hidroxilasas requeridas para la formación de la hidroxiprolina, la cual es el sustrato necesario para la *O*-glicosilación posterior de tipo AGP (Herve et al., 2016).

En la pared celular de las plantas terrestres los glicanos de la matriz extracelular son mayormente pectinas y polisacáridos tales como xiloglucanos y heteroxilanos. En las algas los principales componentes de la matriz de la pared celular son alginatos y fucanos sulfatados. Ha sido propuesto que la presencia de AGP en la superficie celular, junto a pectinas en las plantas terrestres, o junto a alginatos en algas, estaría vinculada con la función de los AGPs como contenedores extracelulares del ion Ca^{2+} , asociado a la regulación de la vía de señalización de Auxina (Lamport et al., 2014).

En las algas rojas cuyo genoma ha sido secuenciado no fueron encontradas evidencias genéticas de la presencia de genes que codifiquen para AGPs o para enzimas con actividad Prolil-4-hidroxilasa (Ulvskov et al., 2013). Aparentemente, el origen genético de los AGPs habría ocurrido en un ancestro de las Cianobacterias con fotosíntesis oxigénica. Luego, por un evento de endosimbiosis de una cianobacteria con un organismo eucariota heterótrofo, se habrían transmitido los AGPs a los grupos existentes de organismos eucariotas fotosintéticos (Knox JP, 2016). Es posible que posteriormente haya ocurrido una pérdida de AGPs en el linaje de las algas rojas, que actualmente no presentan genes de AGPs (Ulvskov et al., 2013).

1.6 ELEMENTOS RIO ABAJO DEL ARABINOGLACTANO TIPO II

Los polisacáridos y glicoproteínas ácidas (en soluciones acuosas de pH neutro) que han sido asociadas a la propiedad adhesiva en las superficies celulares, incluyen a los ácidos pécticos (HG, RGI y RGII) y los arabinogalactanos (AGs). La producción de un mucílago péctico para la fijación y adhesión a las superficies de soporte fue implicada en el aferramiento de la mayoría de las plantas trepadoras (Bowling AJ & Vaughn KC 2008). Adicionalmente, ha sido planteado que el AG representa una fase móvil dentro de los adhesivos botánicos, capaces de penetrar en los intersticios de los sustratos y facilitar la adhesión (Vaughn KC & Bowling AJ, 2011).

En un estudio reciente, las Pectinas y los AGPs fueron identificados como los componentes predominantes del mucílago exudado por las raíces adventicias de *Hedera helix* (la hiedra inglesa). Además, fue relacionada la baja viscosidad intrínseca de la molécula de AGP con una forma esférica de las moléculas, determinada por microscopía de fuerza atómica. El aumento de la viscosidad intrínseca a causa de las interacciones del ácido galacturónico con Ca^{2+} confirmó que la unión electrostática entre los residuos de ácido galacturónico del AG con el calcio constituye la fuerza motriz para la reticulación efectiva (curado) del mucílago (Huang Y et al., 2016).

Hace tiempo fue determinado en tubos polínicos de lirio, que el bloqueo de los AGs por tratamiento con el reactivo β -Glc-Y produce un aumento en el nivel de Ca^{2+} citosólico (Roy et al., 1999). Años más tarde fue observado el mismo efecto de aumento en el nivel de Ca^{2+} citosólico en células de tabaco (Pickard & Fujiki, 2005). Otro efecto del reactivo β -Glc-Y reportado fue la despolimerización de los microtúbulos, y conjuntamente, la deslocalización de LeAGP21 por disrupción de los microtúbulos en células vegetales BY2 de *Lycopersicon esculentum* (Sardar HS, et al., 2006). Así mismo, la desorganización de los microtúbulos por tratamientos con β -Glc-Yariv fue reportada en células de la epidermis radical de *Arabidopsis thaliana* (Nguema-Ona E., et al., 2007).

Los cambios en el nivel de Ca^{2+} citosólico y la organización del citoesqueleto son parámetros importantes durante la formación y la posterior elongación de los pelos radicales (Park & Nebenführ, 2013; Monshausen GB, et al., 2008). Parece probable que el AG participe en la organización del citoesqueleto y en el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} citosólico necesarios para el desarrollo de los pelos radicales (Marzec M, et al., 2015).

1.7 LA EXPANSIÓN CELULAR EN LAS RAICES

En todos los organismos, la morfología de cada célula es esencial para la función que cumple. La morfología de los órganos en una planta es una consecuencia directa de la tasa de división celular y el proceso de expansión celular luego de que las células se han dividido. Para constituir órganos con una morfología determinada, la planta debe controlar cuidadosamente la orientación de la expansión en sus células. La expansión es impulsada por la presión de turgencia, que se genera por el potencial osmótico del contenido en la célula. La presión de turgencia es ejercida en todas las direcciones (isotrópica), por ello para orientar la expansión celular es necesaria la generación de pared celular localizada. De manera que la presión de turgencia tiende a equilibrarse expandiendo la célula en una dirección determinada (anisotrópica o polarizada). Este proceso de expansión anisotrópica o polarizada, es el principal determinante de la morfogénesis en plantas (Roberts, 2001).

El agua y los diversos nutrientes del suelo son absorbidos por las raíces según los requerimientos de las plantas. En algunas especies vegetales la absorción tiene lugar dependiendo de las relaciones simbióticas que se establecen entre las plantas y los organismos del suelo. Además, la raíz tiene como función proveer el anclaje al suelo y la resistencia mecánica para toda la planta. La raíz está constituida por diferentes tejidos que a su vez, incluyen diversos tipos de células. A medida que la raíz crece, las células atraviesan tres etapas de desarrollo. En la zona meristemática las células están en una fase de división celular de división en la zona meristemática, hasta que alcanzan la madurez activamente dividiéndose. En la zona de elongación las células se expanden anisotrópicamente hasta alcanzar su longitud máxima. Finalmente, en la zona de maduración las células desencadenan los procesos de diferenciación de acuerdo a un programa de destino celular, para ejercer actividades específicas (Verbelen et al., 2006) (**Figura 5I**).

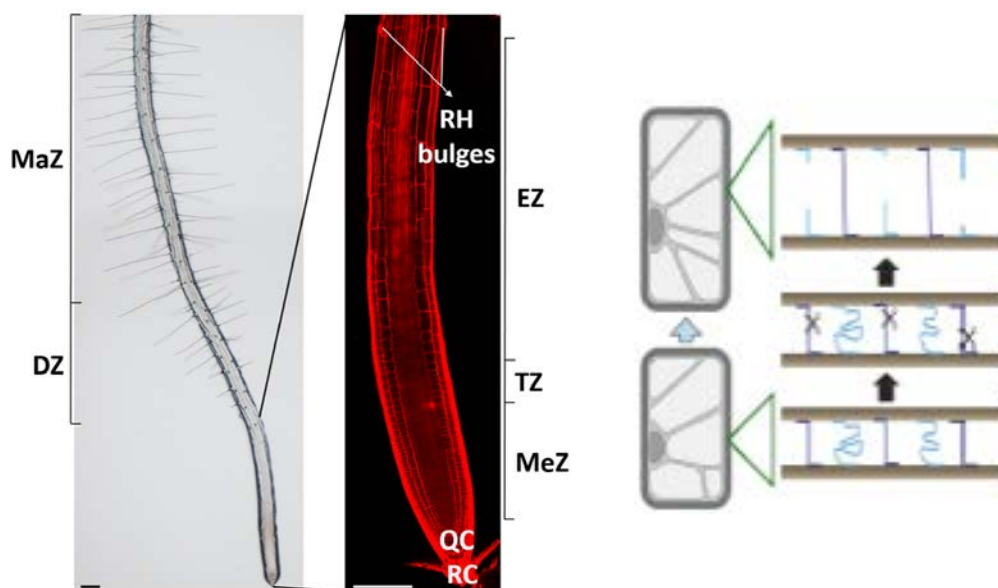


Figura 5I. Expansión celular en la epidermis radical de *Arabidopsis*.

Luego del agregado de yoduro de propidio las paredes celulares se visualizan en rojo. MaZ, zona de maduración; DZ, zona de diferenciación; EZ, zona de expansión; TZ, zona de transición; MeZ, zona meristemática (Balcerowicz et al. 2015). Derecha: Modelo de expansión celular indicando el remodelamiento de las microfibrillas de celulosa (en azul y violeta).

En la zona meristemática donde tienen lugar las divisiones mitóticas se determina el número de células que formarán toda la raíz. Cuando las células atraviesan la etapa de elongación modulan su estado fisiológico preparándose para expandirse en el sentido del crecimiento de la raíz, para ello desarrollan una vacuola central, polarizan el citoesqueleto y remodelan su pared celular. La deposición paralela de microfibrillas de celulosa provee una rigidez lateral a la pared celular dirigiendo la expansión hacia el eje longitudinal. La pared celular comprende microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos y glicoproteínas. La importancia de las microfibrillas de celulosa para controlar la expansión pudo observarse en las mutantes de los genes que codifican para sub-unidades del complejo de la celulosa-sintasa *radial swelling* (*rsw*), y *korrigan* (*kor*) en que esta afectada una (1→4) β-glucosil-endotransferasa, aisladas a partir de un fenotipo defectuoso de crecimiento de la raíz (Baskin et al., 1992; Arioli et al.1998; Peng et al.2000; Lane et al., 2001).

Los AGPs fueron los primeros proteoglicanos implicados en la expansión de las células a partir del uso del reactivo de β-glucosil-Yariv (β-Glc-Y) que se une específicamente y precipita AGPs (Yariv et al.1967; Fincher et al., 1983). Al añadir β-Glc-Y al medio de cultivo de una suspensión de células la expansión fue inhibida (Serpe & Nothnagel 1994; Willats & Knox 1996) así mismo, fue observada la inhibición del crecimiento del tubo polínico (Jauh & Lord 1996). Cuando la planta *Arabidopsis thaliana* germina en un medio de cultivo que contiene el reactivo β-Glc-Y se observó una reducida elongación de la raíz acompañada por la deformación apreciable de las células epidérmicas (Willats & Knox, 1996; Ding & Zhu, 1997). La siguiente conexión entre el proceso de expansión y los AGPs en *Arabidopsis*, apareció con la caracterización de la línea mutante *root epidermal bulger* (*reb1-1*) (Baskin et al., 1992; Baskin et al., 2001) que presenta un fenotipo similar a las raíces WT crecidas en presencia de β-Glc-Y (Willats & Knox 1996). Al caracterizar los componentes de la pared celular en las plantas mutantes *reb-1* se determinó que contienen un 30% en masa, menos de AGP total respecto al WT (Ding & Zhu 1997).

La descripción del fenotipo asociado a *reb1-1* incluye un defecto en la formación de los pelos radicales y una alteración en la morfología de las células epidérmicas (**Figura 6I**), cabe mencionar que además, en plantas *reb1-1* fue descrita la desorganización de los microtúbulos en las células (Andème-Onzighi C, et al., 2002). Las plantas *reb1-1* posteriormente fueron identificadas como mutantes del gen que codifica para la enzima UDP-D-glucosa 4-epimerasa (UGE), que cataliza la conversión de UDP-D-glucosa a UDP-D-galactosa (Seifert GJ et al., 2002) UGE es el donador de D-galactosa específicamente requerido para la galactosilación de los xiloglucanos y de los arabinogalactanos del tipo II del AGP, pero no interviene en la detoxificación de la galactosa o en la biosíntesis de galactolípidos.

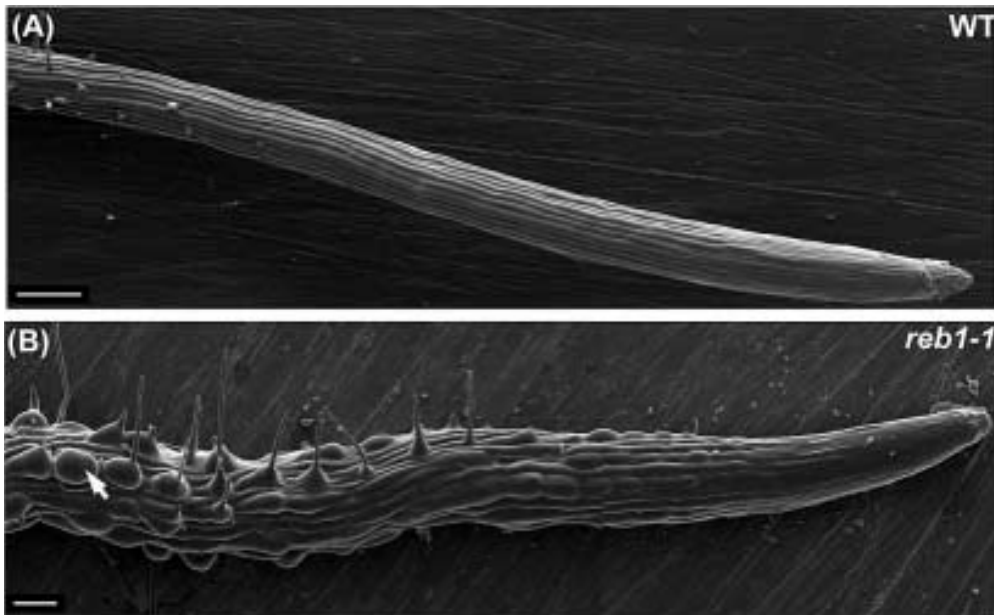


Figura 6I. La morfología celular es alterada en la epidermis radical de las plantas *reb1-1* deficientes del donador de D-galactosa.

Imágenes de la raíz de plantas mutantes *reb1-1* en que se observan las células epidérmicas deformadas (B, flecha blanca) y el acortamiento de la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo (B), respecto a la raíz de plantas WT (A) Barras = 100 μ m (A), 50 μ m (B) (Andème-Onzighi C., et al., 2002).

1.8 EL DESTINO CELULAR TRICOBLASTO/ATRICOBLASTO EN LA EPIDERMIS DE LA RAIZ

Las células que se desarrollan del meristema radical pasan a la zona de elongación y una vez que se han expandido totalmente según su eje longitudinal, comienzan a diferenciarse de acuerdo a su destino celular. En el caso de la epidermis el destino celular puede ser de tricoblasto si la célula se diferencia para la formación del pelo radical, o de atricoblasto si la célula no desarrollará un pelo (Dolan et al., 1993). El destino de las células epidérmicas es regulado de acuerdo a su posición relativa a la unión de dos células corticales, si una célula epidérmica se encuentra en la intersección de dos células corticales al diferenciarse desarrollará un pelo radical, mientras que si la célula epidérmica está en contacto con una sola célula cortical no desarrollará el pelo (**Figura 7I-A**).

Morfológicamente los tricoblastos y los atricoblastos pueden ser reconocidos desde la zona meristemática, Los tricoblastos son más cortos (Dolan et al., 1993), están menos vacuolados (Galway et al., 1994) y presentan una mayor tasa de división celular (Berger et al., 1998). Algunos estudios sugieren que para todas las células de la epidermis existe un destino general de tricoblasto que debe ser inhibido en ciertos linajes de las células, lo que da por resultado la formación de los pelos radicales en algunas filas de las células epidérmicas en las plantas WT (Wada et al., 1997; Lee & Schiefelbein, 1999).

La definición del destino celular tricoblasto/atricoblasto incluye una regulación conjunta por los dos tipos celulares. Uno de los componentes de la regulación es TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG1), que codifica una pequeña proteína con repeticiones WD40 implicadas en interacciones proteína-proteína (Walker et al., 1999). TTG1 forma un complejo con los factores de transcripción *Helix-Loop-Helix* (bHLH) GLABRA3 (GL3) y ENHANCER DE GLABRA3 (EGL3) (Payne et al., 2000; Zhang et al., 2003). Las plantas mutantes de pérdida de función correspondientes a cada uno de los genes respectivos presentan una diferenciación excesiva de tricoblastos, por ello cada uno fue definido como factores del destino atricoblasto (Galway et al., 1994; Zhang et al., 2003) (**Figura 7I**).

La actividad del complejo GL3/EGL3/TTG1 depende de la abundancia relativa del factor de transcripción WEREWOLF (WER), el cual activa la expresión del factor CAPRICE (CPC) que es un regulador negativo de WER (Wada et al., 1997; Lee & Schiefelbein, 1999). Ha sido propuesto que WER se concentra en las células activando y promoviendo a CPC para que migre a la célula epidérmica adyacente, mientras que en la célula en que WER está concentrado se activa el complejo GL3/EGL3/TTG1 generando el destino atricoblasto (**Figura 8I**). El complejo GL3/EGL3/TTG1 activa el factor de transcripción GL2 (Lee & Schiefelbein, 1999) y luego, GL2 inhibe la transcripción del factor específico de tricoblastos ROOT HAIR DEFECTIVE 6 (RHD6) (Masucci & Schiefelbein, 1994; Menand et al., 2007; Lin et al., 2015). En la célula adyacente al atricoblasto en que CPC ha migrado, es inhibida la transcripción de WER en forma creciente y se promueve el destino tricoblasto (Schiefelbein, 2000). A medida que CPC inhibe a WER, la expresión de GL2 disminuye permitiendo la expresión de sus genes blanco reprimidos entre los que se encuentra el factor de transcripción RHD6 (Lee & Schiefelbein, 2002, Wada et al., 2002).

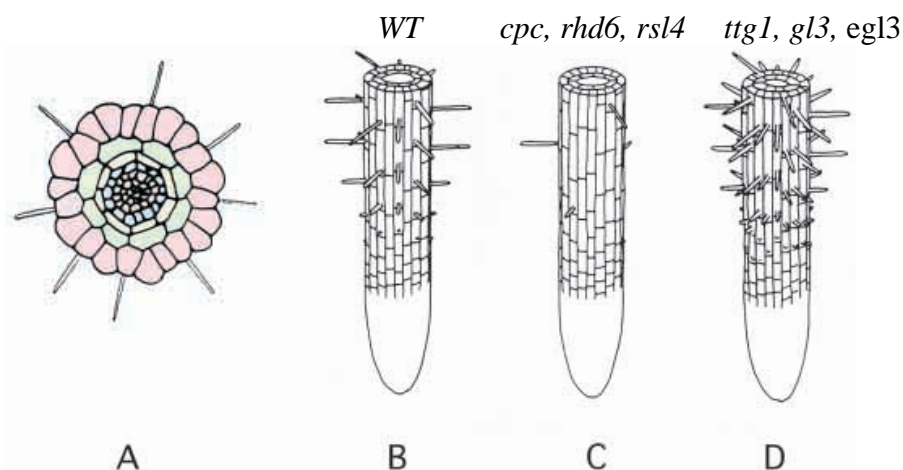


Figura 7I. El destino celular tricoblasto/atricoblasto en *Arabidopsis thaliana*.

Para el destino tricoblasto una célula epidérmica se encuentra en la intersección de dos células corticales, para el destino atricoblasto la célula epidérmica está en contacto con una sola célula cortical (A). En la raíz de la planta WT se establece en destino celular tricoblasto en una fila de células epidérmicas, en forma alternada con las filas de células adyacentes con un destino celular atricoblasto (B). Ante la falta de CPC, RHD6 y RSL4 las raíces son incapaces de desarrollar pelos radicales (C). En las plantas mutantes *ttg1, gl3, y egl3* no se promueve el destino atricoblasto y es desencadenada la formación de pelos radicales en toda la epidermis (D). Referencias en el texto. Adaptado de Wada T, et al., 2002.

El destino tricoblasto o atricoblasto de una célula epidérmica se establece por primera vez durante las primeras etapas de la embriogénesis, mucho antes de los primeros signos de la diferenciación epidérmica. La expresión del factor de transcripción GLABRA2 (GL2) es requerido en las células con destino atricoblasto y puede ser detectado en el embrión en el estadio corazón (Lin & Schiefelbein, 2001). El receptor rico en leucina SCRAMBLED (SCM) contiene un dominio del tipo kinasa inactivo (Chevalier et al., 2005) y es necesario para el correcto establecimiento del destino alternado tricoblasto/atricoblasto (Kwak et al., 2014). SCM regula negativamente la transcripción de WER (Kwak & Schiefelbein, 2008), y es activado por el factor migratorio TRIPTYCHON (TRY), dando por resultado la acumulación de SCM preferencial en tricoblastos.

En los atricoblastos, el complejo WER/GL3/EGL3/TTG1 regula positivamente los factores de transcripción específicos de tricoblastos TRY y ENHANCER OF TRY (ETC1) y así como ocurre con CPC, es estimulada la migración tanto de TRY como de ETC1 a las células adyacentes que serán diferenciadas como tricoblastos (Lee & Schiefelbein, 2002; Bernhardt et al., 2003, Kirik et al., 2004, Koshino-Kimura et al., 2005, Ryu et al., 2005, Simon et al., 2007). Los factores TRY y ETC1 inhiben la interacción de WER con GL3/EGL3 (Lee & Schiefelbein, 2002; Kurata Et al., 2005, Kang et al., 2013). Las células adyacentes con destinos celulares opuestos se regulan mutuamente por migración cruzada de los factores, el cual fue descrito como un mecanismo de inhibición lateral (LIM, Schiefelbein et al., 2014) (**Figura 8I**). La regulación cruzada genera finalmente la expresión específica de los factores de transcripción RHD6 y RSL4 en las células con destino tricoblasto en la epidermis de la raíz (Yi K, et al., 2010).

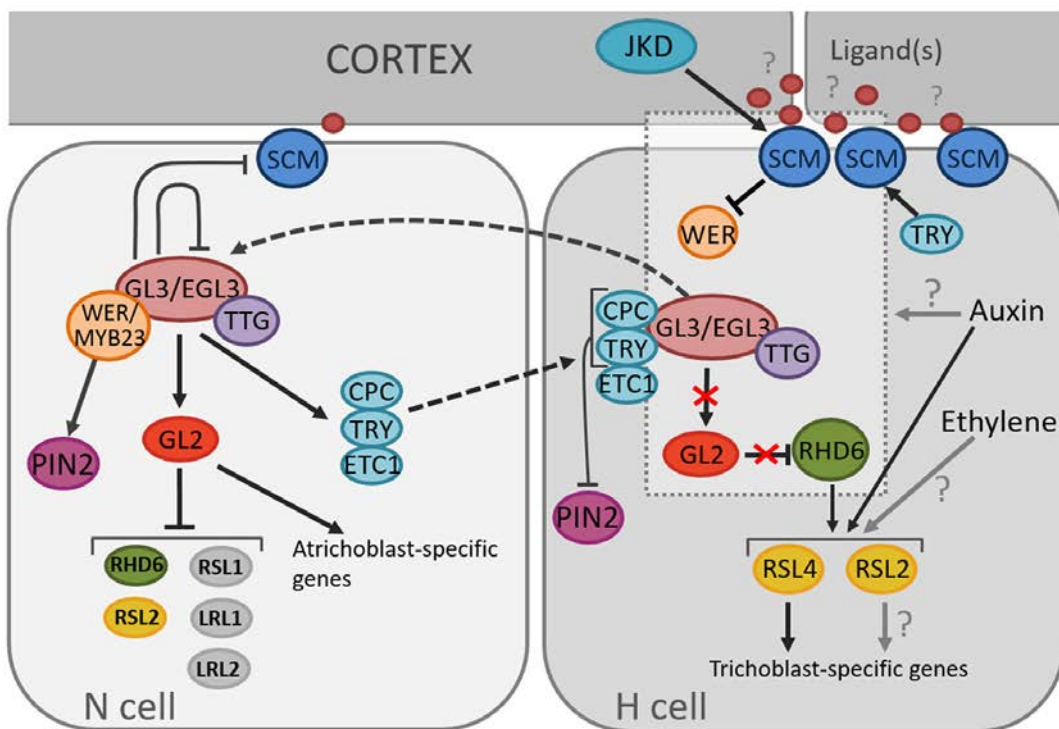


Figura 8I. Modelo de la regulación conjunta de factores del destino tricoblasto y atricoblasto. La célula epidérmica que se encuentra en la intersección de dos corticales (*H cell*) tiene el destino tricoblasto, mientras que la célula adyacente (*N cell*) tiene el destino atricoblasto (Balcerowicz et al.2015).

1.9 LA VIA DE SEÑALIZACION DE BRASINOSTEROIDES EN LA RAIZ

Las investigaciones iniciales de la actividad de brasinoesteroides (BR) revelaron un efecto positivo para la elongación en diferentes órganos de la planta: tallo, hipocotilos crecidos en oscuridad, coleóptilos y mesófilo de las hojas (Sala C, 1985). Los BRs son una clase de hormonas esteroides caracterizadas por la estructura esteroide polihidroxilada, entre las que se destaca el brasinólido (BL) por presentar alta actividad en la vía de señalización (Back, et al., 2000). Los BRs fueron reconocidos como fitohormonas al ser identificados los genes de la biosíntesis y la percepción de BR, incluidos *detiolated2* (DET2), *Constitutive Photomorphogenesis & Dwarfism* (CPD), y *Brassinosteroid Insensitive1* (BRI1). Las mutantes de pérdida de función de estos genes presentan defectos en la elongación del hipocotilo, enanismo, pecíolos reducidos, desarrollo de la floración retrasado y menor fertilidad masculina (Szekeres et al., 1996; Li & Chory, 1997).

En *Arabidopsis thaliana* han sido identificados dos componentes principales de la vía de señalización de BR: el receptor de membrana de BR llamada *Brassinosteroid Insensitive1* (BRI1) y una quinasa citoplasmática llamada *Brassinosteroid Insensitive2* (BIN2). En la vía de BR se encuentran dos factores de transcripción responsables de la activación de la expresión de los genes blanco: *Suppressor 1* (BES1) *Brassinazole resistant 1* (BZR1). Fueron reportados los mutantes constitutivamente activos de los respectivos factores, *bes1-D* y *bzr1-1D* (*bzr1-D*), que son capaces de rescatar el fenotipo de crecimiento enano de las plantas *bri1-116* y *bin2-1D* (Yin et al., 2002; Wang Z-Y, et al., 2002; He J-X, et al., 2002). Cuando la hormona BR es reconocida por su receptor BRI1 y el co-receptor SERK3 (BAK1) (Nam KH & Li J, 2002) se produce la activación de la fosfatasa BSU1 en el citoplasma. Luego, BSU1 reconoce su proteína blanco BIN2 y la desfosforila inactivándola y permitiendo la actividad de los factores de transcripción BZR1 y BES1 (BZR2) (Hartwig T & Wang Z-Y, 2015) (**Figura 9I**).

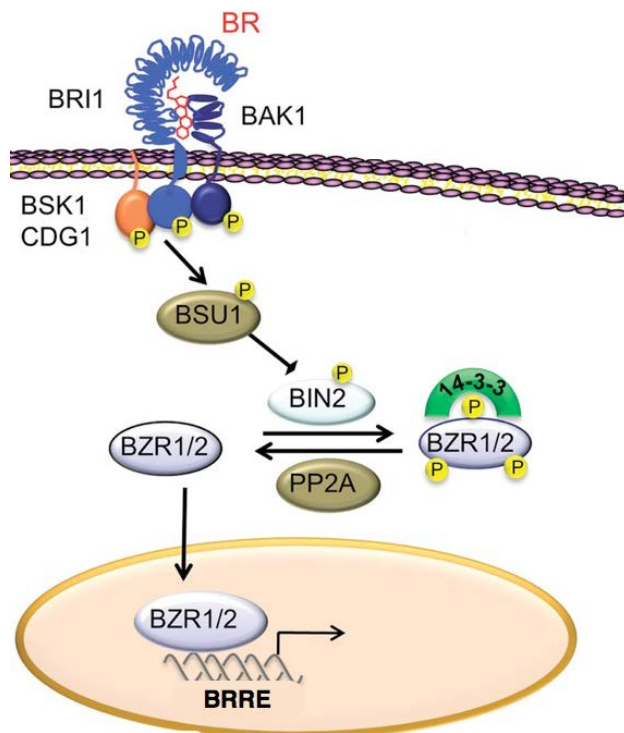


Figura 9I. Modelo de la vía de señalización de Brasiñoesteroides.

La hormona BR se une al receptor BRI1 y al co-receptor BAK1 y promueve la transfosforilación de los receptores, activando la vía de señalización. Luego BAK1 fosforila a BSK1 (CDG1) y es activada BSU1. BSU1 inhibe a BIN2, logrando que la fosfatasa PP2A libere a los factores de transcripción BZR1 Y BZR2, que pueden migrar al núcleo y unirse a los elementos de respuesta de Brasiñoesteroides (BRRE), a un E-Box y/o a un G-Box, regulando la expresión de los genes blanco. Adaptado de Hartwig T & Zhi-Yong Wang, 2015.

BIN2 fue identificado como la kinasa *glycogen synthase kinase 3* GSK3, también llamada *SHAGGY-like kinase* (He J-X, et al., 2002). La versión mutante puntual de BIN2 de ganancia de función *bin2-1* presenta un fenotipo de crecimiento reducido, similar al observado en la mutante del receptor de BR *bri1-116*, y también, al causado por la disrupción bioquímica de la vía de BR (Li J & Nam KH, 2002). La planta triple mutante *bin2-3/bil1/bil2* (*knock out* de BIN2 y de sus dos homólogos más cercanos SK2-2 y SK2-3) presenta un fenotipo constitutivo similar a una actividad aumentada de la vía de BR (Vert & Chory, 2006; Yan Z, et al., 2009).

La actividad de kinasa por BIN2 en plantas mutantes *bin2-1* de ganancia de función, presenta mayores niveles de BZR1 en su forma fosforilada. BZR1 fosforilado es reconocido por E3 ligasas y enviado a proteasoma para su degradación. BIN2-GFP ha sido observada en citoplasma y dentro del núcleo, mientras que *bin2-1*-GFP se acumula preferentemente en el núcleo. Adicionalmente al fusionar BIN2 con un péptido de señalización nuclear la inhibición de la vía de BR aumenta significativamente, lo que sugiere que BIN2 fosforila los factores blanco BES1 y BZR1 dentro del núcleo (Vert & Chory, 2006).

BIN2 ha resultado ser un componente determinante para la regulación del destino celular en la epidermis de la raíz, dado que fue demostrado que WER y TTG1 son factores blanco para la fosforilación por BIN2 (Cheng et al., 2014). La fosforilación de WER y TTG1 inhibe la actividad del complejo WER/GL3/EGL3/TTG1, lo que conlleva a la inhibición de la transcripción de GL2 y promueve el establecimiento del destino celular tricoblasto. Previamente fue publicado que la transcripción tanto de WER como de GL2 fueron inducidas por tratamiento con BL en las raíces (Kuppusamy et al., 2009) (**Figura 10I**). Complementariamente, en plantas sobreexpresantes del receptor BRI1 se observó la expresión ectópica de GL2 en células de la epidermis que por su ubicación relativa debieran ser tricoblastos (Cheng et al., 2014).

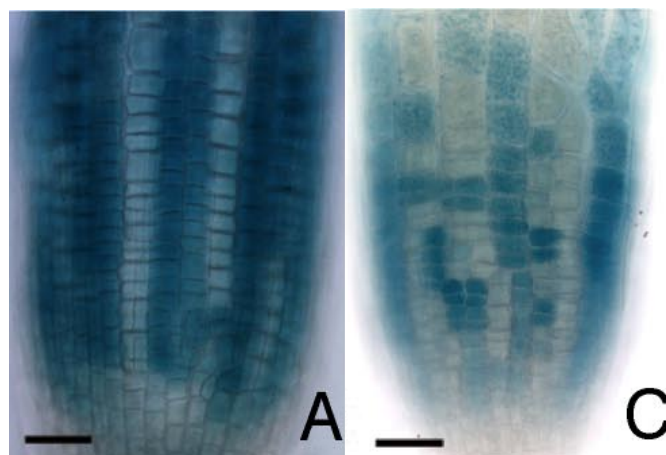


Figura 10I. La falta de BRs reprime la expresión del factor GL2 de destino atricoblasto.

Imágenes de células epidérmicas de raíz que expresan el promotor de GL2 río arriba de GUS (GL2::GUS) en plantas WT (A) o en la mutante *bri1-116* (C) (Kuppusamy et al., 2009).

Actualmente es aceptado el modelo en que la vía de BR activa a través del receptor BRI1 inhibe a BIN2 y por ello induce positivamente la expresión de WER en los futuros atricoblastos. La acumulación de WER estimula la acumulación y luego, la migración de CPC a las futuros tricoblastos en células adyacentes, probablemente por plasmodesmos. Una vez que CPC ha migrado a la célula adyacente tricoblasto comenzaría a inhibir la transcripción de WER y GL2, lo que desencadenaría la acumulación de SCM en tricoblastos (Schiefelbein J, et al., 2014).

Es posible que la activación preferencial de BRI1 en atricoblastos sea una consecuencia de la ubicación relativa de cada célula epidérmica respecto a la intersección de las células corticales asociada a la distribución preferencial en atricoblastos de la hormona BR (Kwak & Schiefelbein, 2008; Kuppusamy et al., 2009; Cheng et al., 2014) (Figura 11I).

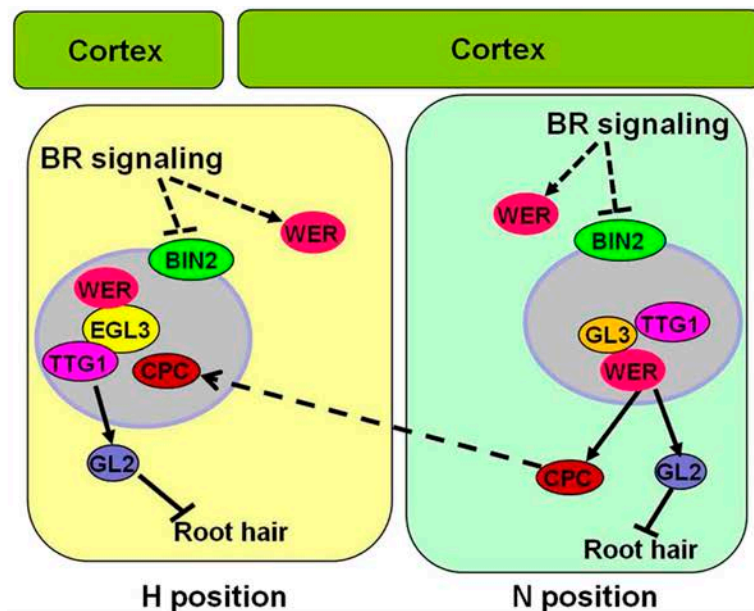


Figura 11I. Modelo de la regulación por BR de factores del destino tricoblasto y atricoblasto.

Las células epidérmicas que se encuentran en la intersección de dos corticales (*H position*) tienen el destino tricoblasto (*Root Hair Cell*), mientras que la célula adyacente (*N position*) tiene el destino atricoblasto (*Non-Hair Cell*), en la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Cheng et al., 2014).

2. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Objetivo general

Determinar el rol biológico del AGP21 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

- 1- Estudiar el rol biológico del AGP21 en el desarrollo de la raíz.
- 2- Determinar el impacto de la *O*-arabinogalactosilación en el rol del AGP21.
- 3- Identificar los genes responsables de la regulación del AGP21.
- 4- Determinar de que manera la señalización por BR se relaciona con la función de AGP21.

Hipótesis de trabajo

- 1- El AGP 21 tiene un rol biológico relevante para el desarrollo de la raíz.
- 2- La *O*-arabinogalactosilación es necesaria para la función del AGP21.
- 3- La expresión del AGP 21 es regulada por BRs.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MEDICIÓN DE FENOTIPOS DE DIFERENCIACIÓN DE PELO RADICAL Y EXPANSIÓN CELULAR

3.1.1 Crecimiento de las plántulas.

Para todos los ensayos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) salvajes (*wild type* = WT) como controles, y los genotipos indicados en cada caso. Para el crecimiento de las plántulas se esterilizaron las semillas colocándolas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% v-v en agua destilada durante 13 minutos y posteriormente con 3 lavados en agua grado MiliQ estéril. Las semillas se mantuvieron en agua grado MiliQ durante 3 días a 4°C y en oscuridad para su vernalización. Luego de vernalizadas las semillas se colocaron en placas cuadradas transparentes con medio de cultivo Murashige & Skoog al 50% de lo indicado (MS 0,5) junto con agar de plantas Duchefa al 0,8% m-v. Las placas fueron selladas con cinta microporosa, y colocadas a 4°C en oscuridad durante 3 días para asegurar la sincronización de la germinación en todas las semillas. Las placas fueron colocadas en forma vertical en una cámara de cultivo (marca: *Biocontrol*) a 22°C con un ciclo de 16 hs luz/8 hs oscuridad (intensidad de la luz: 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$), y luego de 7 días de crecidas las plántulas se realizaron las observaciones en lupa o microscopio confocal.

3.1.2 Determinación de los fenotipos de diferenciación de células epidérmicas a pelo radical, expansión y división celular.

Al cabo de 7 días de crecidas las plántulas en los medios de cultivo de cada ensayo se colocaron las placas en lupa (Olympus SZX7) y se obtuvieron fotografías con un aumento total de 50X de los ápices radicales para determinar el fenotipo de aparición del primer pelo radical, y también de las zonas de la raíz en que se observaron los pelos radicales totalmente desarrollados para determinar el % de los pelos adyacentes. A partir de las fotografías de los ápices radicales se trazó una recta segmentada con el *software* ImageJ, siguiendo una misma fila de células epidérmicas desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo observado y se determinó la distancia en milímetros (mm) según escala. A partir de las fotografías de pelos radicales se contaron las cantidades de pelos adyacentes respecto al total de pelos (mayor o igual a 50) y se determinó el % de pelos adyacentes para cada raíz por separado (n=30).

Las plántulas crecidas durante 7 días fueron retiradas de las placas y montadas en presencia de yoduro de propidio (IP, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para observar las raíces con las paredes celulares teñidas de rojo mediante microscopía confocal (λ máx. ex.= 536 nm, λ máx. em.= 617 nm). A partir de las fotografías de las células epidérmicas de la zona expandida de la raíz se trazó una recta con el *software* ImageJ (<http://www.imagej.nih.gov/ij/>) de cada célula epidérmica y se determinó la

longitud en micrómetros (μm) según escala. A partir de las fotografías de los ápices radicales teñidos con IP se contaron las células correspondientes a la zona meristemática desde el centro quiescente hasta la primera célula cuadrada. Así mismo, se contaron las células correspondientes a la zona de expansión, luego de la última célula meristemática hasta la aparición del primer pelo radical. Todos los resultados se graficaron y procesaron con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0 (<https://www.graphpad.com/>).

3.2 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS DE PLÁNTULAS

3.2.1 Ensayo de bloqueo de AGPs por reactivo de Yariv.

Se utilizó como bloqueador específico de arabinogalactanos el reactivo de β -glucosil-Yariv (β -Glc-Y), que consiste en: 1,3,5-tri-(*p*-glucosiloxifenilazo)-2,4,6-trihidroxibenceno (**Figura 1M**). Para comprobar que el efecto de β -Glc-Y en la diferenciación de las células epidérmicas y expansión celular estaba asociada específicamente al bloqueo de los arabinogalactanos se utilizó el reactivo α -Manosil-Yariv (α -Man-Y) que no interactúa con AGPs. El α -Man-Y consiste en: 1,3,5-tri-(*p*-manosiloxifenilazo)-2,4,6-trihidroxibenceno. Tanto el β -Glc-Y como el α -Man-Y fueron sintetizados de acuerdo con el procedimiento original de Yariv (Yariv J, 1967) por la Dra. Marina Ciancia del Departamento de Química Orgánica de la FCEN-UBA.

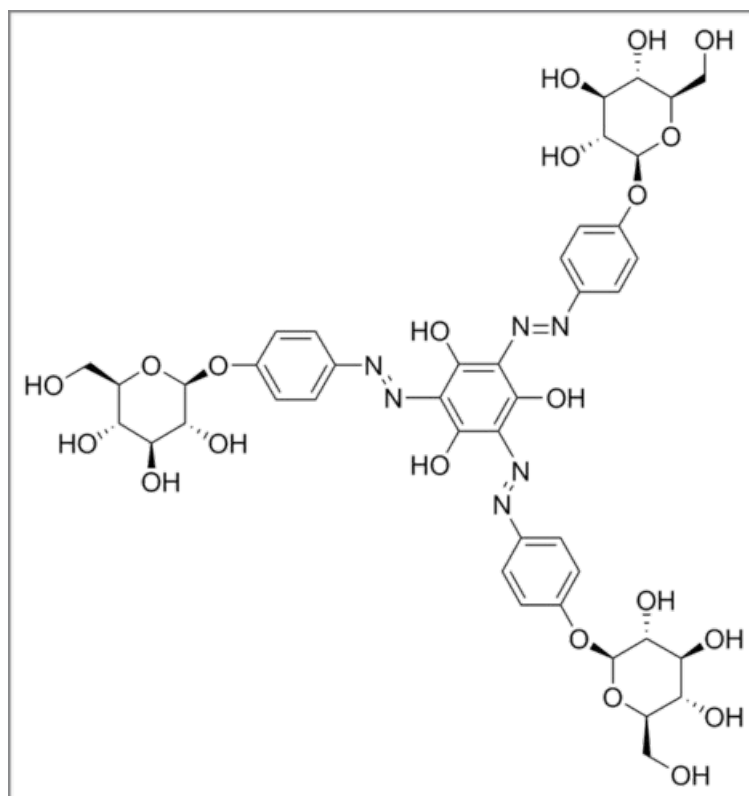


Figura 1M. Estructura del reactivo β -Glc-Y β -glucosil-Yariv.

Para todos los tratamientos se prepararon las placas con medio de cultivo en condiciones de esterilidad y al momento de colocar el medio de cultivo fundido y enfriado parcialmente en las placas, se agregaron las alícuotas de los reactivos de manera de lograr las concentraciones finales indicadas en cada caso. Para la determinación de las dosis inhibitoria 50 (IC₅₀) se definió el 0% de inhibición con los valores de fenotipo del control WT sin tratamiento, mientras que el 100% de inhibición se definió con los valores de fenotipo del WT en la máxima concentración utilizada. Del gráfico de los valores normalizados respecto al logaritmo en base 10 de la concentración molar de cada reactivo se obtuvo la regresión lineal y por interpolación al 50% de inhibición se determinó la concentración IC₅₀. Todos los valores fueron procesados y graficados con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0

3.2.2 Ensayo con inhibidores de la actividad de P4Hs.

Para los tratamientos de inhibición de la hidroxilación de prolinas se utilizaron: *α-α dipiryridyl* (DP) (Majamaa et al., 1986) que es un quelante del catión Fe²⁺ necesario para la reacción, y además, *ethyl-3,4-dihydrobenzoate* (EDHB) (Dauplais et al., 1997) inhibidor competitivo por el sitio de unión del 2-oxoglutarato a la enzima prolil4-hidroxilasa. En todos los tratamientos se prepararon las placas con medio de cultivo en condiciones de esterilidad y al momento de colocar el medio de cultivo fundido y enfriado parcialmente en las placas, se agregaron las alícuotas de los reactivos de manera de lograr las concentraciones finales indicadas en cada caso. Para la determinación de las dosis inhibitoria 50 (IC₅₀) se definió el 0% de inhibición con los valores de fenotipo del control WT sin tratamiento, mientras que el 100% de inhibición se definió con los valores de fenotipo del WT en la máxima concentración utilizada. Del gráfico de los valores normalizados respecto al logaritmo en base 10 de la concentración molar de cada reactivo se obtuvo la regresión lineal y por interpolación al 50% de inhibición se determinó la concentración IC₅₀. Todos los valores fueron procesados y graficados con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0.

3.3 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS GENES DE AGPs

3.3.1 Niveles de expresión de AGPs en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Desde la base de datos de Genevestigator se determinó el nivel de expresión de todos los AGPs de acuerdo a las cantidades de transcritos determinados por RNAseq en plántulas crecidas entre 7 y 10 días (n=332), de *Arabidopsis thaliana*. Se obtuvo el perfil de expresión de todos los AGPs en raíz basados en las cantidades de transcritos determinados por hibridación en *chip* de Affimetrix (n=803). A partir de los AG péptidos (pequeños péptidos AGPs que consisten únicamente en el motivo de *O*-glicosilación) que más se expresaban en las plántulas y así mismo, que estaban altamente expresados en raíz se eligió analizar la importancia del gen que codifica para AGP21 respecto a la diferenciación del pelo radical y la expansión celular.

3.4. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS MUTANTES

3.4.1 Extracción de ADN de plantas.

Se realizó la extracción de tejido vegetal de hojas de roseta de plantas crecidas en tierra al cabo de 3 semanas. Se tomaron 2 hojas grandes de cada planta y se congelaron en nitrógeno líquido en tubo *ependorf* de 1,5 ml. Luego se procedió a moler el tejido y se agregó 500 µl de buffer de extracción 2X CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA) y 5 µl de RNasa A (BioAmerica), y se incubaron las muestras en un baño térmico a 65°C por término de 30 minutos. Luego, se dejó que las muestras se enfríen a temperatura ambiente y se agregó bajo campana 500 µl de cloroformo. Se agitó y se centrifugó por 10 minutos a 18000 G, la fase acuosa se trasvaso y se agregó 1 volumen de alcohol *iso*-propílico frío para lograr la precipitación del ADN. Se centrifugó a 4°C por 10 min a 18000G, se descartó el sobrenadante y se obtuvo un pellet. Al pellet se le agregó 1 ml de alcohol etílico 70% v-v y se agitó suavemente. Se volvió a centrifugar a 4°C por 10 min a 18000G y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet en estufa a 37°C por 10 minutos y luego, se resuspendió en 50 µl de agua MiliQ (Weigel&Glazebrook, 2002).

3.4.2 Identificación de plantas mutantes de T-DNA.

Se usó *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) como el genotipo salvaje (*Wild Type*: WT). El resto de las semillas de las diferentes líneas mutantes insercionales de Transposon-ADN (T-ADN) fueron pedidas a *Arabidopsis Resource Center* (ABRC; <https://www.abrc.osu.edu/>). Estas líneas contienen un único fragmento de ADN de transposón insertado al azar en el genoma de *Arabidopsis*. Las plantas mutantes de T-ADN contienen una única secuencia de transposón inserta al azar en alguna región del genoma, produciendo una alteración en la secuencia del ADN que puede corresponder a diferentes elementos de un gen determinado: región promotora, 5'UTR, 3'UTR, exón, intrón. De esta forma el gen comprometido por la presencia del transposón suele presentar un menor nivel de expresión que lo normal, en las respectiva mutante de T-ADN, aunque en casos excepcionales puede resultar en la sobreexpresión del gen comprometido (**Figura 2M**).

Para la identificación de las plantas homocigotas de T-ADN, se extrajo ADN genómico y se realizó una reacción de PCR para comprobar la presencia de la inserción en heterocigosis u homocigosis. Para ello se realizaron 2 PCRs por cada inserto T-ADN y para cada planta mutante a identificar: una PCR para detectar la presencia del inserto T-ADN con *primer forward* que reconoce la secuencia del transposón y *primer reverse* que se une a la secuencia del gen; y otra PCR con *primer forward* y *reverse* que se unen a la secuencia del gen para detectar la planta WT (**Figura 2M, Tabla 1M**). Los *primers* utilizados para cada genotipo fueron diseñados con el software *T-DNA Primer Design* (<http://signal.salk.edu/tADNprimers.2.html>) (**Tabla 2 Anexo**). La PCR para el genotipado fue: 95° por 5 min, (95°C por 45 seg, 57°C por 45 seg, 72° por 1 min) x 35 ciclos, 72° por 5 min.

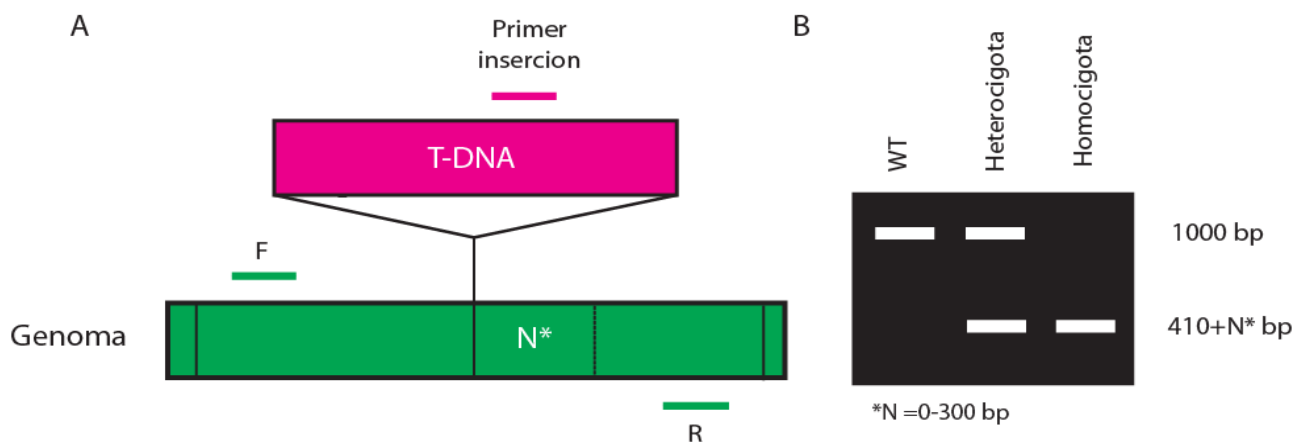


Figura 2M. PCR para determinar las líneas T-ADN homocigotas mutantes.

A) Los 3 primers utilizados: el F (forward), y el R (reverse) que se unen a la secuencia del gen, y el primer de la inserción que se une específicamente a la secuencia del transposón. B) Bandas esperadas en una corrida electroforética en gel de agarosa, de los productos de PCR obtenidos con los primers forward WT, reverse WT y el primer T-ADN para el transposón inserto. Dependiendo si la planta analizada resulta ser WT, heterocigota u homocigota para la inserción del transposón, se obtendrán bandas de distinto tamaño.

Tabla 1M. Líneas de T-ADN mutantes generadas en esta tesis.

Código AGI	Mutante T-ADN	Código T-ADN	Sitio de inserción estimado	Amplicón T-ADN (bp)	Amplicón WT (bp)
AT5G11740	<i>agp15.1</i>	WiscDsLox383F8	chr5 3784129	452-752	1109
AT5G11740	<i>agp15.2</i>	SALK_114736S	chr5 3783808	510-810	1041
AT3G61640	<i>agp20.1</i>	SALK_092212C	chr3 22810820	565-865	1103
AT3G61640	<i>agp20.2</i>	SAIL_849_C06	chr3 22811018	597-897	1146
AT1G55330	<i>agp21</i>	SALK_140206	chr1 20649120	595-895	1119
AT1G08280	<i>gt29-A</i>	SAIL_1259_C01	chr1 2609427	541-841	1228

3.4.3 Obtención de dobles mutantes mediante cruzamientos.

Los doble mutantes *agp15-agp21* y *agp20-agp21* fueron obtenidos por cruzamiento colocando las anteras con polen de uno de los mutantes simples en los pistilos florales del otro mutante. Luego se realizó una PCR en la generación F2 para confirmar la presencia de los T-ADN correspondientes en estado homocigotas.

3.4.4 Extracción de ARN de plantas.

Las plantas mutantes homocigotas para el T-ADN identificadas fueron crecidas en placas durante 1 semana en condiciones normales, luego fueron retiradas las raíces cuidadosamente y se congelaron en nitrógeno líquido en tubo *ependorf* de 1,5 ml. Se molieron las raíces con émbolos estériles y libres de enzima RNAsa. Se agregó 800 µl de buffer de extracción RNazol (Molecular Research center Inc.) y luego se agregó 300 µl de agua libre de RNAsa y se agitó vigorosamente. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó por a 12000 G durante 15 minutos. Se tomó la fase acuosa y trasvaso a un tubo libre de RNAsa y se agregó 1 volumen de alcohol *iso*-propílico frío para lograr la precipitación del ARN y se centrifugó a 12000G durante 10 minutos a 4°C) se descartó el sobrenadante y se obtuvo un pellet. Al pellet se lavó dos veces con 1 ml de alcohol etílico 75% v-v y se agitó suavemente. Se volvió a centrifugar a 4°C por 10 min a 18000G y se descartó el sobrenadante. El pellet de ARN total se resuspendió en 30 µl de agua MiliQ.

3.4.5 Análisis de los niveles de transcritos por RT-PCR.

Las muestras con 2-5 µg de ARN fueron utilizadas para generar los ADN copia (ADNc) mediante reacción enzimática por M-MLV Retro-transcriptasa (Promega) con *primers* de oligo-dT, según indicaciones del manual de la RT de Promega. A partir del ADNc proveniente de raíces crecidas durante 7 días, se realizó la amplificación por PCR de las secuencias correspondientes a los ARN mensajeros del gen de AGP21 y del gen que codifica para la fosfatasa PP2A (AT1G69960) como control de los niveles de transcritos. Los *primers* utilizados para cada ARN mensajero fueron diseñados con el software *Beacon Designer*, PREMIER Biosoft International (http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/) y comprobados para que fueran específicos para dichos transcritos (Tabla 2 Anexo). La PCR consistió en: 95° por 5 min, (95°C por 30 seg, 63°C por 30 seg, 72° por 30 seg) x 35 ciclos, 72° por 5 min.

3.5 GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

3.5.1 Clonados del gen AGP21 y vectores utilizados.

De la secuencia de ADN correspondiente al gen AT1G55330 de *Arabidopsis* correspondiente al AGP21 se diseñó el ADN sintético con la secuencia codificante para la proteína fluorescente Venus incluida entre la secuencia que codifica para la vía secretoria y la secuencia que codifica para el péptido maduro de AGP21 en el mismo marco de lectura (GenScript). La secuencia sintética de Venus-AGP21 contaba en sus extremos los sitios AttB necesarios para su recombinación en vectores de entrada Gateway (pDONOR201).

Se realizó el clonado de la región promotora del gen AGP21 consistente en 1,5 kilo pares de bases río arriba del sitio de comienzo de la transcripción para el gen. El promotor de AGP21 (AGP21p) se amplificó mediante la reacción de PCR con primers que reconocen la secuencia promotora y que en sus extremos 3' contenían la secuencia para su corte y recombinación en un vector de entrada Gateway (pENTRY4Dual). Los ADNc amplificados por PCR fueron chequeados por digestión con enzimas de restricción y mediante secuenciación (Macrogen; <http://www.macrogen.com>).

La tecnología de Gateway (Thermo Fisher Scientific) consiste en la generación de un vector de entrada (pENTRY, pDONOR) por ligación con el inserto de interés. La recombinación y ligado del inserto con el vector de entrada ocurre en los sitios AttB que posee el inserto y los sitios AttP que posee el vector de entrada vacío, la reacción es catalizada por un mix de enzimas llamado Clonasa BP® que contiene la integrasa y excisionasa del fago λ y el factor de integración del huésped (Integration Host Factor; *IHF*) de *E.coli*. Para generar el vector de destino que se utilizará para transformar plantas, se realiza una segunda reacción de recombinación y ligación con un vector de destino (PGWB) pMDC) en los sitios de recombinación AttL del vector de entrada con inserto y los sitios AttR del vector de destino vacío, la reacción es catalizada por un mix de enzimas llamado Clonasa LR® que contiene la integrasa y excisionasa del fago λ , y el *IHF* de *E.coli* (Curtis&Grossniklaus, 2003; Nelson et al., 2007).

El ADN sintético de Venus-AGP21 fue clonado en el vector de destino pGWB2 que incluye río arriba del sitio de recombinación el promotor constitutivo 35-S del virus de mosaico del tabaco, resultando la construcción para sobreexpresar la proteína de secreción AGP21 fusionada a la proteína fluorescente Venus (35-Sp::V-AGP21). La región promotora del gen AGP21 de 1,5 Kbp fue clonada en el vector de destino pGWB4 que incluye río abajo del sitio de recombinación la proteína fluorescente GFP, resultando la construcción fluorescente reportera para el promotor endógeno del gen AGP21 (AGP21p::GFP).

El ADN sintético de Venus-AGP21 fue clonado en el vector de destino pGWB1 y luego, en el vector resultante fue sub-clonada la región promotora del gen AGP21 de 1,5 Kb mediante enzimas de restricción y posterior ligación. Obteniéndose la construcción para expresar la proteína de secreción AGP21 fusionada a la proteína fluorescente Venus bajo el control del promotor endógeno clonado de AGP21 (AGP21p::V-AGP21). Los vectores de destino pGWB1, pGWB2 y pGWB4 son vectores binarios de manera que pueden ser replicados en bacterias y también en plantas.

Tabla 2M. Vectores utilizados para las construcciones de los clonados de AGP21

Construcción generada	Vector Gateway de entrada	Vector Gateway de destino
35-Sp::V-AGP21	pDONR201	pGWB2
AGP21p::GFP	pENTRY4Dual	pGWB4
AGP21p::V-AGP21	pENTRY4Dual	pGWB1

3.5.2 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium*.

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) transformada con los diferentes clonados del gen AGP21 para transformar las plantas. La cepa GV3101 de *Agrobacterium* se transformó con cada construcción clonada por electroporación, que consiste en una descarga eléctrica que produce poros momentáneos en la membrana bacteriana permitiendo el ingreso de los vectores. Luego se seleccionaron las colonias que incluyeran los vectores con el antibiótico Kanamicina en una concentración de 50 mg/ml, y simultáneamente las cepas que contuvieran el plásmido pMP90 con los antibióticos Gentamicina y Rifamicina a 50 mg/ml cada una.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 fueron transformadas con la construcción sobreexpresante de Venus-AGP21 (Col-0/35-Sp::V-AGP21), o con la construcción fluorescente reportera para el promotor endógeno del gen AGP21 (Col-0/AGP21p::GFP). Las plantas mutantes *agp21* fueron transformadas con la construcción que expresa Venus-AGP21 bajo el promotor endógeno de AGP21 clonado (*agp21*/AGP21p::V-AGP21). Las plantas transgénicas se obtuvieron mediante *Floral Dip* (Weigel & Glazebrook, 2006), la técnica consiste en sumergir las flores por unos minutos en una suspensión de las *Agrobacterium* que incluyan los vectores clonados de AGP21. Para ello se prepararon los cultivos seleccionados de *Agrobacterium* y se dejaron crecer a 28 °C con agitación durante 24 hs. Luego se centrifugaron los cultivos por 5 min a 5000G y se resuspendió en 5 ml de agua miliQ con el detergente iónico Silwet® a una densidad óptica= 0,1.

3.5.3 Expresión transiente en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

A partir del cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que contenía el vector de destino pGWB2 sobreexpresante de la proteína Venus fluorescente fusionada a AGP21 (35-Sp::V-AGP21) se transformaron hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se preparó el cultivo de *Agrobacterium* y se dejó crecer a 28 °C con agitación durante 24 hs. Luego se centrifugó el cultivo por 5 min a 5000G y se

resuspendió en 5 ml de agua miliQ con acetosiringona (500 μ M) (Wydro et al., 2006) y MgCl₂ (10 mM) a una densidad óptica= 0,2. La suspensión se dejó a 4°C durante 3 hs y luego se infiltraron las caras abaxiales de hojas de *Nicotiana* con jeringa cuidando de no producir roturas en las hojas. Al cabo de 2 días posteriores a la infiltración se observó la expresión de Venus-AGP21 con microscopio confocal en las membranas celulares, y también en el espacio apoplástico luego de realizar plasmólisis mediante el agregado de sorbitol 80 mM (Venus λ máx. ex.= 515 nm, λ máx. em.= 528 nm).

3.5.4 Identificación de las plantas transgénicas por resistencia y expresión de la fluorescencia.

Las plantas que fueron transformadas por *Floral Dip* se dejaron crecer en cámara de cultivo hasta que produjeron semillas y estas, se recolectaron para la selección de las plantas transgénicas. Las semillas fueron esterilizadas y colocadas en placas con medio de cultivo Murashige & Skoog al 50% de lo indicado (MS 0,5) junto con agar de plantas Duchefa al 0,8% m-v, y con el antibiótico de selección Higromicina en una concentración de 30 mg/ml. Las placas fueron colocadas en oscuridad en cámara de cultivo durante 5 días, al cabo de los cuales las plantas resistentes al antibiótico elongaron los hipocotilos, mientras que las plantas que no incluyeron los vectores clonados no crecieron. Las placas con las plantas resistentes a la selección por antibiótico fueron colocadas nuevamente en cámara de cultivo con luz para desencadenar la fotomorfogénesis y luego de 7 días se observaron en lupa de epi-fluorescencia (Olympus SZX7) y al microscopio (Zeiss LSM 510 Meta) para confirmar la expresión de las proteínas fluorescentes (Venus λ máx. ex.= 515 nm, λ máx. em.= 528 nm; GFP λ máx. ex.= 488 nm, λ máx. em.= 507 nm).

3.5.5 Obtención de plantas mutantes transgénicas por cruzamientos.

Las plantas mutantes del receptor de la hormona Brasinoesteroide BRI1 (AT4G39400) (*bri1-116*) fue cruzada con las plantas reporteras fluorescentes para el promotor endógeno del gen AGP21 (Col-0/AGP21p::GFP). Para ello se colocaron las anteras con polen de Col-0/AGP21p::GFP en los pistilos florales de *bri1-116*. La descendencia F1 de la cruce se recolectó y se seleccionaron las plantas transgénicas que expresaran GFP y simultáneamente que presentaran adelantamiento de pelo radical y una mayor diferenciación de células epidérmicas a pelos radicales. Se recolectó a su vez la descendencia F2 y nuevamente, se seleccionaron las plantas transgénicas que expresaran GFP y además que presentaran el fenotipo de crecimiento anormal de las plantas homocigotas mutantes *bri1-116*, de manera de obtener plantas transgénicas reporteras del promotor de AGP21 en el fondo mutante *bri1-116* homocigota (*bri1-116*/AGP21p::GFP).

3.6 DETERMINACIONES A PARTIR DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

3.6.1 Extracción de proteínas y ensayo de Western Blot.

Se realizó una extracción de proteínas tanto solubles como de membrana, de raíces de plántulas crecidas al cabo de 15 días en medio de cultivo Murashige & Skoog al 50% de lo indicado (MS 0,5) junto con agar de plantas Duchefa al 0,8% m-v. Las raíces fueron molidas con mortero en nitrógeno líquido y luego se agregó el buffer de extracción (SDS 30%, 50 nM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA, inhibidor de proteasas y PMSF 0,2 M). Se centrifugó 10 min a 21500 G y tomó el sobrenadante con el extracto proteico. El extracto de proteínas fue corrido en gel de poliacrilamida al 30% y luego transferido a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Bio-Rad). Para la determinación del peso molecular de la proteína de fusión Venus-AGP21 se realizó un *Western Blott* utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP en una dilución 1:1000 (Roche) y un anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de remolacha en una dilución 1:10000 (Roche). La membrana fue revelada con el equipo Phosphoimager (Fuji).

3.6.2 Obtención de imágenes por microscopía confocal y determinación de localización celular.

Al cabo de 7 días de crecidas las plántulas transgénicas fluorescentes en los medios de cultivo de cada ensayo se montaron las raíces en portaobjetos de vidrio y se observó al microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta o Zeiss LSM 5 Pascal) y se obtuvieron imágenes con un aumento total de 100X o 200X de los ápices radicales, de células epidérmicas diferenciadas y expandidas totalmente, de pelos radicales, de hipocotilos, de mesófilo de las primeras hojas verdaderas y de tricomas. Se utilizaron las siguientes configuraciones (láser excitación, λ de excitación, espejo dicróico, filtro de emisión) para la observación de GFP: Ar, 488 nm, 515 nm, 505-550 nm; para Venus o YFP: Ar, 488 nm, 545 nm, 505-600 nm; mCherry He-Ne, 543 nm, 545 nm, 600 LP; para ioduro de propidio Ar, 488 nm, 545 nm, 650 LP. Para la adquisición de imágenes se realizaron *z-stacks* (entre 10 y 15 planos focales a una distancia de 3 μ m), los cuales fueron procesados posteriormente con el software ImageJ.

3.6.3 Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en imágenes de microscopía confocal.

Para cuantificar la intensidad de fluorescencia se utilizaron imágenes adquiridas en el microscopio confocal según el fluoróforo a cuantificar (láser excitación, λ de excitación, % intensidad, espejo dicróico, filtro de emisión, *pinhole*) para la observación de GFP: Ar, 488 nm, 30%, 515 nm, 505-550 nm, 551 nm; para Venus o YFP: Ar, 488 nm, 30%, 545 nm, 505-600 nm, 574 nm. Se trazó un eje segmentado desde el ápice radical y siguiendo una misma fila de células hasta una distancia de 1 mm aproximadamente. Las intensidades de fluorescencia por pixel fueron

obtenidas con el comando *plot profile* del programa ImageJ (<http://www.imagej.nih.gov/ij/>) y la correspondencia de cada pixel con la distancia en micrómetros la realizó el ImageJ al procesar los metadatos de las imágenes en forma automática. En cada raíz fueron trazados 5 ejes diferentes que se consideraron como réplicas, a su vez se midieron 30 raíces para cada cuantificación. Los resultados se graficaron con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0 (<https://www.graphpad.com/>).

3.6.4 Capacidad de difusión de proteínas por ensayo de Recuperación de la Fluorescencia luego del Fotoblanqueo (FRAP).

Para llevar a cabo el experimento de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) se definió una región de interés (ROI) circular de 10 µm de diámetro, con el centro sobre un punto de la membrana plasmática con señal de fluorescencia. Se registró las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia en la ROI definida durante 60 segundos para comprobar que la señal de fluorescencia era constante, con un porcentaje del láser de excitación al 30% (similar al utilizado para las observaciones de localización). Luego se adquirió una imagen de microscopía confocal para la comparación previa al fotoblanqueo. Para realizar el fotoblanqueo se configuró la intensidad del láser al 100% y se incidió luz a la misma longitud de onda de excitación (488 nm) durante 20 segundos únicamente en la ROI definida. Se adquirió una imagen de microscopía confocal posterior al fotoblanqueo con el láser de excitación nuevamente al 30% y, al comprobar que la intensidad disminuyó significativamente se comenzó a adquirir los datos del promedio de la intensidad de fluorescencia cada 5 segundos, en toda la superficie de la ROI. Los valores fueron procesados y graficados con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0.

Los datos de intensidad adquiridos fueron normalizados y expresados como % de intensidad recuperada luego de normalizarse según la ecuación (1):

$$(1) \%I = [(I_t - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min})] 100\%$$

Donde %I: es el porcentaje de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo.

I_t : es la intensidad de fluorescencia adquirida cada 5 segundos de la recuperación.

I_{\min} : es la intensidad mínima de fluorescencia adquirida en toda la recuperación.

I_{\max} : es la intensidad máxima de fluorescencia adquirida en toda la recuperación

El gráfico de la intensidad de fluorescencia normalizada a lo largo del tiempo de recuperación fue ajustado a una función exponencial de asociación en una fase según la ecuación (2):

$$(2) Y_x = Y_0 + (Y_{\max} - Y_0) (1 - e^{-kx})$$

Donde Y_x : es el valor del % de intensidad a cada tiempo x .

Y_0 : es el valor del % mínimo de la intensidad.

Y_{\max} : es el valor del % máximo de intensidad.

k : es la constante de la función exponencial.

x : es la variable tiempo en segundos.

3.7 MODELADO POR DINÁMICA MOLECULAR DE AGP21

Las simulaciones por dinámica molecular (MD) fueron realizadas por el Dr. Hugo Verli de la Universidad Federal do río Grande do Sul. Para la MD fueron seleccionados dos péptidos no glicosilados y en siete péptidos glicosilados, cuya secuencia corresponde al motivo del tipo AGP: Ala1-Pro2-Ala3-Pro4-Ser5-Pro6-Thr7-Ser8 (APAPSPTS), en las que la estructura inicial fue construida como una hélice de poliprolina del tipo II ($\phi \sim -75$; $\psi \sim 145$). Los motivos en los péptidos no-glicosilados se diferencian por la presencia de prolina (APAPSPTS) en lugar de *4-trans-hidroxiprolina* necesaria para la *O*-glicosilación (AOAOSOTS). Los motivos glicosilados reflejan diferentes glicoformas peptídicas construidas como glicosiladas completamente (AOAOSOTS). En todos los sitios de *O*-glicosilación fueron asociados un oligo-sacárido del tipo arabinogalactano, en los cuales las cadenas de glicano y las uniones entre carbohidratos y aminoácidos fueron construidas basados con las geometrías más prevalentes obtenidas del resultado de MD de sus respectivos di-sacáridos, generando las coordenadas iniciales para los cálculos de MD del glico-péptido (Pol-Fachin&Verli, 2012). Luego, las estructuras fueron solvatadas en cajas rectangulares utilizando las condiciones del límite periódico. Para las estructuras dadas se utilizó el modelo de agua SPC (Berendsen et al., 1986). Los motivos tanto de carbohidratos como de los péptidos han sido descrito bajo los parámetros del campo de fuerza GROMOS96 43a1, y todas las simulaciones de MD se llevaron a cabo con la simulación GROMACS, versión 4.5.4 (Hess et al., 2008).

El método de Lincs (Hess et al., 1997) fue aplicado para reducir las longitudes de las uniones covalentes, permitiendo un paso de integración de 2 fseg luego de la energía inicial de minimización, mediante la utilización del algoritmo Steepest Descents. Las interacciones electrostáticas fueron calculadas con el método generalizado del campo de reacción (Tironi et al., 1995). La temperatura y la presión fueron mantenidas como constantes en 310° K y 1.0 atmósfera respectivamente, por asociación de los glicopéptidos y el solvente a baños externos bajo el termostato V-rescale (Bussi et al., 2007) y el baróstato de Berendsen (Berendsen et al., 1984) mediante las constantes de $t= 0.1$ y $t= 0.5$, respectivamente vía escalado isotópico coordinado. Los sistemas fueron calentados lentamente desde 50°K hasta 310°K en etapas de 5 pseg, con un incremento de 50°K de la temperatura de referencia en cada paso. Luego de esta termalización todas las simulaciones fueron además extendidas a 100 nseg.

Tabla 3M. Lista de genes, plantas mutantes y plantas transgénicas utilizadas

Gen	Código AGI	Fondo Mutante	Línea Transgénica	Referencia
P4H2	AT3G06300	<i>p4h2,p4h5,p4h13</i>	-	<i>Velasquez et al., 2011</i>
P4H5	AT2G17720		-	
P4H13	AT2G23096		-	
GT29-A	AT1G08280	<i>gt29-A</i>	-	<i>Dilokpimol et al., 2014</i>
RAY1	AT1G70630	<i>ray1</i>	-	<i>Gille et al., 2013</i>
AGP15	AT5G11740	<i>agp15</i> <i>agp15,agp21</i>	-	Esta Tesis Esta Tesis
AGP20	AT3G61640	<i>agp20</i> <i>agp20,agp21</i>	-	Esta Tesis Esta Tesis
AGP21	AT1G55330	<i>agp21</i> <i>agp21/</i> Col-0 Col-0	- AGP21p::V-AGP21 35-Sp::V-AGP21 AGP21p::GFP	Esta Tesis Esta Tesis Esta Tesis Esta Tesis
Líneas mutantes de la vía de Brasinoesteroides				
BRI1	AT4G39400	<i>bri1-5</i> <i>bri1-116</i> <i>bri1-116/</i>	- - AGP21p::GFP	<i>Noguchi T, et al., 1999</i> <i>Li J, et al., 1997</i> Esta Tesis
BZR1	AT1G75080	<i>bzr1-D</i> Col-0	BZR1p::BZR1-YFP	<i>Wang Z-Y, et al., 2002</i> <i>Chaiwanon J, et al., 2015</i>
BES1	AT1G19350	<i>bes1-D</i>	-	<i>Yin Y, et al., 2002</i>
BIN2	AT4G18710	<i>bin2-1</i> <i>bin2,bil1,bil2</i>	-	<i>Kim T-W, et al., 2012</i>
BIL1	AT2G30980		-	<i>Yan Z, et al., 2009</i>
BIL2	AT1G06390		-	
Marcadores de identidad tricoblasto-atricoblasto				
RHD6	AT1G66470	Wt Col-0	RHD6p::RHD6-GFP	<i>Menand B et al., 2007</i>
RSL4	AT1G27740	Wt Col-0	RSL4p::RSL4-GFP	<i>Yi K, et al., 2010</i>
GL2	AT1G79840	Wt Col-0	GL2p::GL2-GFP	<i>Lin Y, et al., 2001</i>
EXPA7	AT1G12560	Wt Col-0	EXP7p::nGFP	<i>Kim DW, et al., 2006</i>

4. RESULTADOS

4.1 IMPACTO DEL BLOQUEO DE LOS O-ARABINO GALACTANOS DE AGPs EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

4.1.1 El bloqueo de los AGPs promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.

El reactivo de β -Glucosil-Yariv (β -Glc-Y) se une específicamente a oligosacáridos de al menos siete a nueve residuos de (1 \rightarrow 3) β -galactosilo presentes únicamente en los arabinogalactanos del tipo II (Kitazawa, et al., 2013) (**Tabla 1A**). El reactivo de β -Glc-Y actúa como un bloqueador específico de los AGPs (**Figura 1M**). Para determinar si el bloqueo de los AGPs impacta en la diferenciación epidérmica a tricoblastos, se crecieron plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 en medio de cultivo que contenía β -Glc-Y a diferentes concentraciones. Como control del tratamiento se utilizó el reactivo alfa-Manosil-Yariv (α -Man-Y) que no interactúa con los arabinogalactanos, en las mismas concentraciones utilizadas (McCartney L, et al., 2003). Se pudo observar un claro efecto en el aumento del porcentaje de células epidérmicas que se diferencian como tricoblastos, así como la aparición anticipada de los pelos radicales, a causa del bloqueo progresivo de los AGPs por β -Glc-Y (**Figura 1R**). Por el contrario, tanto el desarrollo de pelos adyacentes como la distancia de aparición de los primeros pelos radicales en plantas crecidas en condiciones de control se mantuvieron en valores similares con distintas concentraciones del reactivo α -Man-Y.

La diferenciación de una célula epidérmica en un tricoblasto se pone en evidencia morfológicamente con la aparición del pelo radical. En el caso de dos células adyacentes epidérmicas que se diferencian en tricoblastos se observan pelos radicales en filas adyacentes de células epidérmicas (**Figura 1R-A y B**, flecha roja). El efecto del aumento de la diferenciación de la epidermis a pelo radical sigue una tendencia aproximadamente lineal hasta una concentración de 10 μ M de β -Glc-Y. Es posible que a partir de esa concentración se hayan bloqueados todos los AGPs presentes que están involucrados en la diferenciación en tricoblastos en la epidermis de la raíz. Sin embargo, cuando β -Glc-Y esta presente en altas concentraciones se observó un acortamiento general de las raíces y un mayor desarrollo de raíces adventicias (resultados no mostrados).

El adelantamiento de la aparición del primer pelo radical es manifestado por el acortamiento de la distancia entre el ápice radical y el primer pelo más cercano. Esa distancia incluye a las células pertenecientes a la zona meristemática y a la zona de elongación de la raíz. El efecto del adelantamiento de la aparición del primer pelo radical presenta una tendencia lineal asociada a las mayores concentraciones de β -Glc-Y (**Figura 1R-C**).

4.1.2 El bloqueo de los AGPs inhibe la expansión y la división celular en las raíces.

En la raíz, la división celular tiene lugar únicamente en la zona meristemática (ZM). Durante el desarrollo las células más alejadas del centro quiescente pertenecientes a la ZM comienzan a expandirse y pasan a pertenecer a la zona de elongación (ZE). El número de células en la ZM define consecuentemente el número de células que se expanden en la ZE de la raíz. El proceso de expansión celular en la ZE de la raíz junto con el número de células establecido en la ZM, definen el fenotipo de elongación de la raíz primaria.

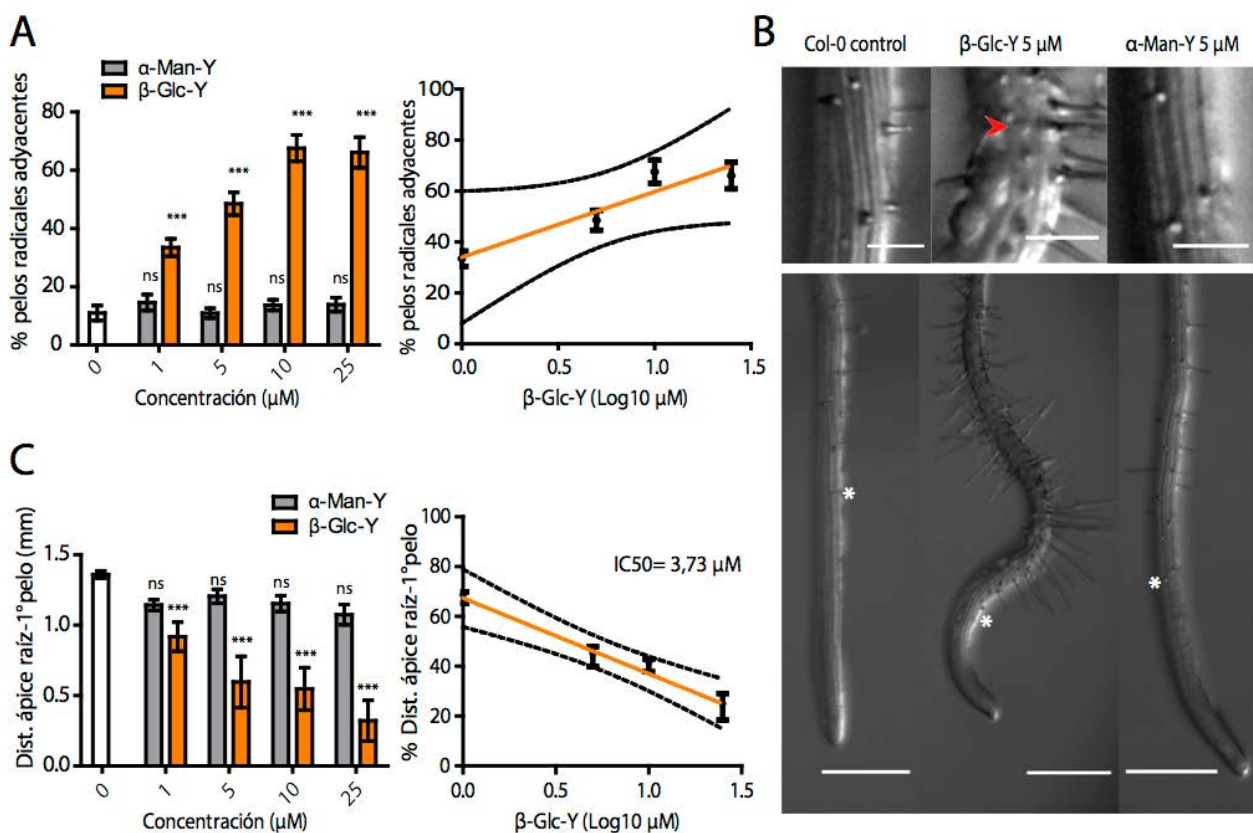


Figura 1R. El bloqueo de los AGPs promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.

A) El % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas aumenta a mayores concentraciones del reactivo β-glucosil-Yariv (β-Glc-Y), mientras que no se observa efecto alguno con el reactivo de control alfa-Manosil-Yariv (α-Man-Y). B) imágenes de raíces de plántulas crecidas durante 7 días en presencia de β-Glc-Y, α-Man-Y, o en ausencia de ambos reactivos. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); Escala: 100 μm. Panel inferior, se indica la aparición del primer pelo radical (estrella blanca); Escala: 0,5 mm. C) la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo disminuye a mayores concentraciones del reactivo β-Glc-Y, mientras que no se observa efecto alguno con el reactivo de control α-Man-Y. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas. En las gráficas de regresión lineal (recta naranja) se muestran las medias con el error medio respecto al Log10 de la concentración molar de β-Glc-Y y el intervalo de confianza 95% de la regresión lineal (curva negra). Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC50) las medias fueron normalizadas respecto al control.

Los efectos por β -Glc-Y en el adelantamiento de la aparición del pelo radical se pueden deber a una inhibición de la expansión celular o con defectos en el desarrollo de la ZM. Se midió la longitud de las células epidérmicas expandidas, y también se contabilizó el número de células de la ZM y de la ZE hasta la aparición del primer pelo. Se utilizaron raíces de *Arabidopsis* crecidas en presencia de β -Glc-Y, o α -Man-Y como control del tratamiento. Las raíces fueron observadas con microscopio confocal luego de la tinción de las paredes celulares con la sonda fluorescente yoduro de propidio. El bloqueo progresivo de los AGPs por β -Glc-Y mostró una disminución de la longitud de máxima expansión de las células epidérmicas y además, redujo el número de células de la ZM y de la ZE (**Figura 2R**). La longitud de máxima expansión de las células epidérmicas se mantuvo en valores similares con el aumento de las concentraciones del reactivo de control α -Man-Y. No se observó ningún efecto en el número de células de las zonas meristemática y de elongación por presencia del reactivo α -Man-Y.

La disminución de la longitud máxima de las células epidérmicas expandidas y la reducción en el número de células de la ZM y de la ZE presentaron una tendencia lineal asociada a mayores concentraciones de β -Glc-Y (**Figura 2R-A y 2R-C**). Para definir un valor de concentración de β -Glc-Y en que se observó un 50% del efecto de inhibición de la expansión celular, o del número de células en las ZE y ZM, se considera como el 100% a los valores de cada fenotipo en condiciones de control. En todos los casos se ajustó a una recta de regresión respecto al logaritmo de la concentración molar de β -Glc-Y, permitiendo el cálculo de la concentración de β -Glc-Y correspondiente al 50% del control (IC_{50}).

El β -Glc-Y tuvo un efecto en la tasa de división celular reduciendo el número de células en la ZM de la raíz, y también inhibió la expansión celular observada. Ambos efectos combinados explican el adelantamiento de la aparición del primer pelo radical determinado previamente (**Figura 1R**). El fenotipo de diferenciación de células epidérmicas adyacentes como tricoblastos no parece fundamentarse en la inhibición de la expansión celular, o en la reducción del número de células de la ZM causados por β -Glc-Y. Esto presupone un posible rol adicional de los AGPs a los procesos de expansión celular descritos anteriormente (Ding & Zhu 1997; Willats & Knox 1996).

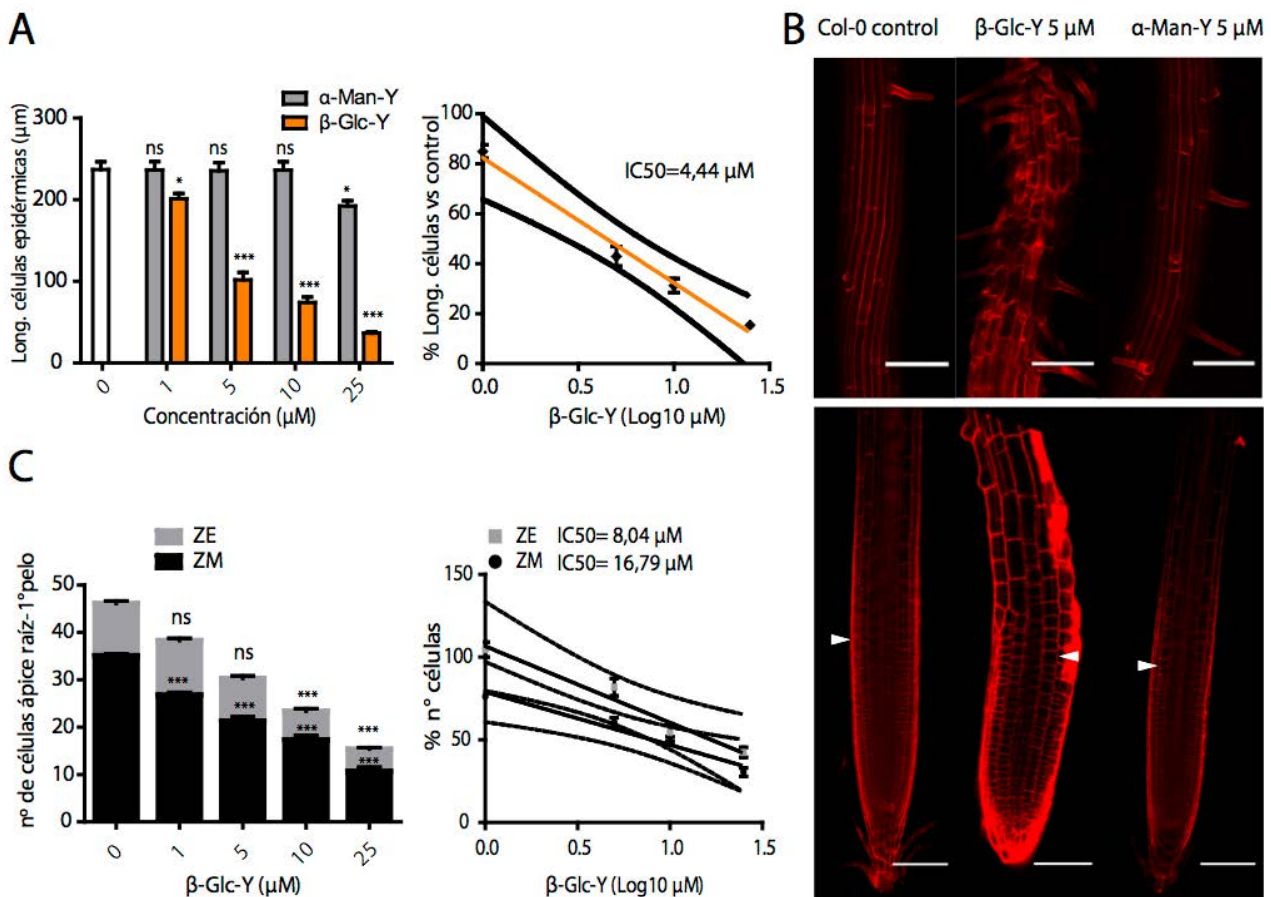


Figura 2R. El bloqueo de los AGPs inhibe la expansión y la división celular en las raíces.

A) la longitud de las células epidérmicas disminuye a mayores concentraciones del reactivo β -glucosil-Yariv (β -Glc-Y), mientras que no se observa efecto alguno con el reactivo control α -Manosil-Yariv (α -Man-Y). **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces luego de la tinción con ioduro de propidio de plántulas crecidas durante 7 días en presencia de β -Glc-Y, α -Man-Y, o en ausencia de ambos reactivos; Escala 100 μ m. Panel superior, células epidérmicas expandidas. Panel inferior, se indica el final del meristema radical (flecha blanca). **C)** el número de células pertenecientes a la zona meristemática (ZM) y a la zona de elongación hasta la aparición del primer pelo (ZE) disminuye a mayores concentraciones del reactivo β -Glc-Y. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso $n=30$. Los asteriscos indican * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; ns, diferencias no significativas. En las gráficas de regresión lineal (recta naranja) se muestran las medias con el error medio respecto al Log10 de la concentración molar de β -Glc-Y y el intervalo de confianza 95% de la regresión lineal (curva negra). Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) las medias fueron normalizadas respecto al control.

4.1.3 La inhibición de la hidroxilación de prolinas promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos, en las raíces.

Los AGPs son *O*-arabinogalactosilados en un átomo de oxígeno perteneciente a los residuos de hidroxiprolina en el péptido AGP. La presencia de hidroxiprolina en los péptidos se produce por la modificación postraduccional de hidroxilación de los residuos de prolinas y dicha reacción es catalizada por las enzimas de la familia Prolil 4-hidroxilasas (P4Hs). Los principales péptidos sustratos de las P4Hs son las proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), entre las que se encuentran los AGPs y las Extensinas (**Figura 2I**). Sin embargo, cualquier péptido de la vía secretoria que incluya en su secuencia residuos de prolina en un contexto favorable, es un potencial sustrato para la hidroxilación de prolinas por las P4Hs. Existen dos inhibidores descritos para la hidroxilación de prolinas: *α - α dipyridyl* (DP) que actúa como un quelante del catión Fe^{2+} necesario para la reacción (Barnett, 1970), y *ethyl-3,4-dihydrobenzoate* (EDHB) que es un inhibidor competitivo por el sitio de unión del 2-oxoglutarato a la enzima P4H (Majamaa et al., 1986; Vlad et al., 2010).

La inhibición de la hidroxilación de prolinas por presencia de DP o EDHB produjo el aumento del porcentaje de células epidérmicas que se diferencian como tricoblastos, y aparición anticipada de los pelos radicales únicamente en altas concentraciones para ambos inhibidores (150 μ M para el DP, 300 μ M para EDHB) (**Figura 3R y Figura 4R**).

El efecto del aumento de la diferenciación de la epidermis a pelo radical y el acortamiento de la distancia de aparición del primer pelo radical, a causa de la inhibición de la hidroxilación de prolinas, no siguen una tendencia claramente lineal al ser graficados respecto al logaritmo de la concentración de los inhibidores utilizados. Esto indica que la inhibición de la hidroxilación de prolinas causada por DP y EDHB no tiene un efecto tan claro como el reactivo de β -Glc-Y para el bloqueo de los AGPs, lo cual podría deberse a que otros péptidos sustratos de las P4Hs podrían tener efectos compensatorios para los fenotipos analizados. A su vez, en el caso de DP (quelante del catión Fe^{2+}) se podría estar produciendo un efecto pleiotrópico a distintos niveles de la homeostasis de hierro en las raíces. El EDHB actúa como un inhibidor agonista en todos los dominios catalíticos presentes en las enzimas del tipo 2-oxigenasas que utilizan 2-oxoglutarato como co-sustrato.

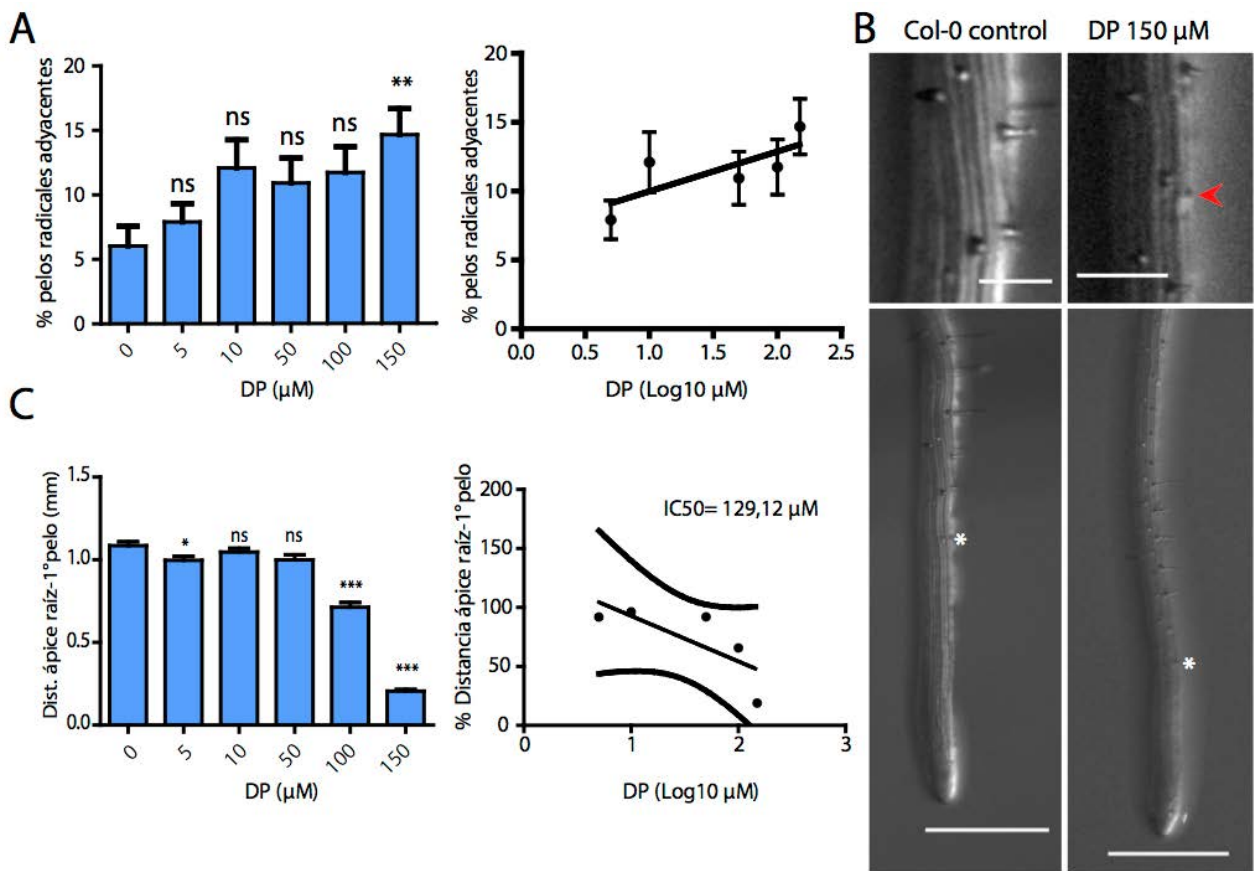


Figura 3R. La inhibición de la hidroxilación de prolinas por DP, promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.

A) el % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas aumenta a mayores concentraciones del inhibidor de la hidroxilación de prolinas α,α -dipiridil (DP). **B)** imágenes de raíces de plántulas crecidas durante 7 días en presencia de DP o condiciones control. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); Escala 100 μm . Panel inferior, se indica la aparición del primer pelo radical (estrella blanca); Escala 0,5 mm. **C)** la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo disminuye a mayores concentraciones del inhibidor DP. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso $n=30$. Los asteriscos indican * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; ns, diferencias no significativas. En las gráficas de regresión lineal (recta negra) se muestran las medias con el error medio respecto al Log10 de la concentración molar de DP y el intervalo de confianza 95% de la regresión lineal (curva negra). Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) las medias fueron normalizadas respecto al control.

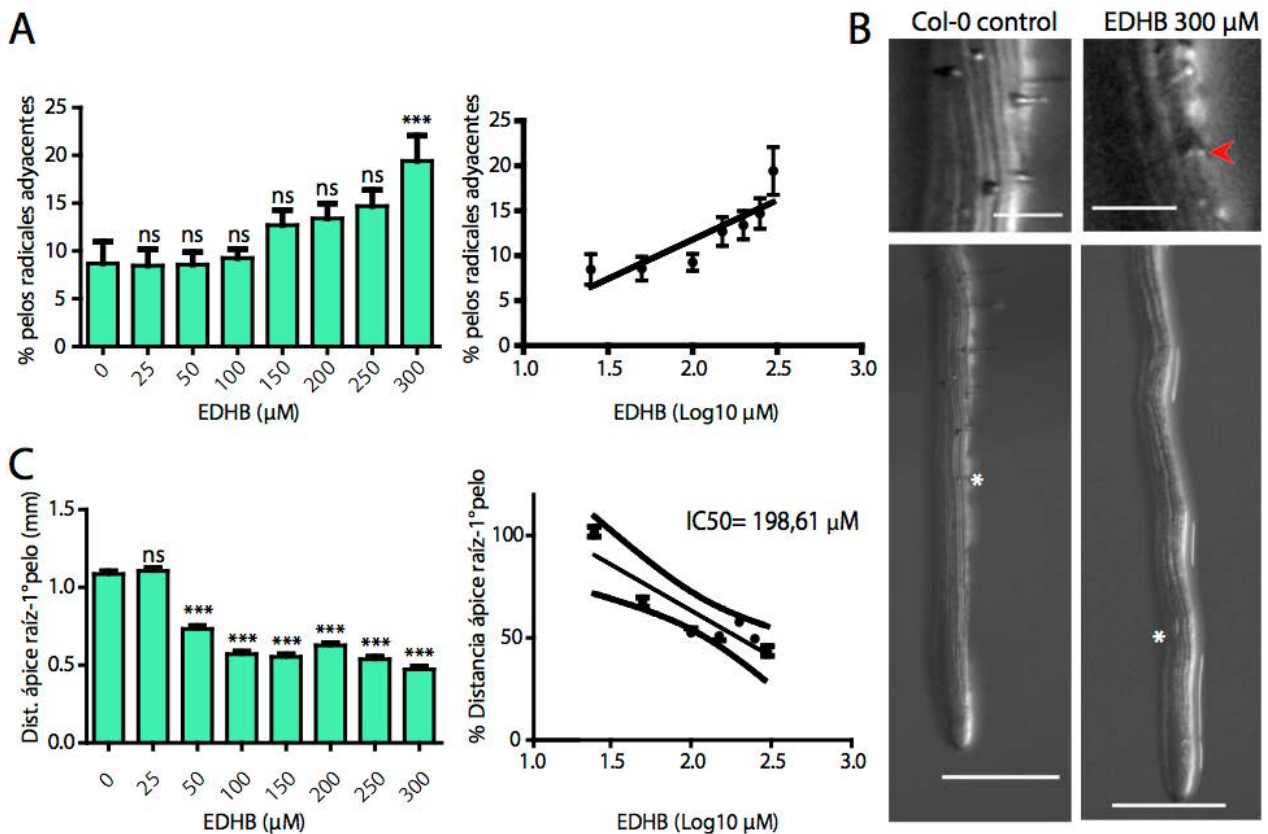


Figura 4R. La inhibición de la hidroxilación de prolínas por EDHB, promueve la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.

A) el % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas aumenta a mayores concentraciones del inhibidor competitivo de la hidroxilación de prolínas etil-dihidroxi benzoato (EDHB). **B)** imágenes de raíces de plántulas crecidas durante 7 días en presencia de EDHB o condiciones control. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); Escala 100 μm . Panel inferior, se indica la aparición del primer pelo radical (estrella blanca); Escala 0,5 mm. **C)** la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo disminuye a mayores concentraciones del inhibidor EDHB. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso $n=30$. Los asteriscos indican * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; ns, diferencias no significativas. En las gráficas de regresión lineal (recta negra) se muestran las medias con el error medio respecto al Log10 de la concentración molar de EDHB y el intervalo de confianza 95% de la regresión lineal (curva negra). Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) las medias fueron normalizadas respecto al control.

4.1.4 La inhibición de la hidroxilación de prolinas reduce la expansión y la división celular en las raíces.

El adelantamiento de la aparición del primer pelo radical es observado en presencia de los inhibidores de la hidroxilación de prolinas DP y EDHB (**Figura 3R y Figura 4R**). Para relacionar ese fenotipo con un defecto en la expansión celular o con una deficiencia en la tasa de división celular en la ZM, se analizó la longitud de las células epidérmicas expandidas y se contabilizó el número de células de la ZM y de la ZE hasta la aparición del primer pelo. Esto se observó con microscopio confocal luego de la tinción de las paredes celulares con la sonda fluorescente yoduro de propidio.

Las inhibición de la hidroxilación de prolinas por DP y EDHB produjo la disminución de la longitud de máxima expansión de las células epidérmicas y también, la reducción en el número de células de la ZM y de la ZE. Así mismo, la disminución de la longitud máxima de las células epidérmicas expandidas y la reducción en el número de células de la ZM y de la ZE, presentaron una tendencia lineal respecto al aumento de la concentración de DP y EDHB) en cada caso (**Figura 5R y Figura 6R**).

Los valores obtenidos de IC₅₀ a partir de las correspondientes rectas de regresión para los inhibidores DP y EDHB resultaron de al menos un orden de magnitud mayor al compararlos con los valores obtenidos para el reactivo β -Glc-Y, para el fenotipo de adelantamiento de pelo radical y la expansión de las células epidérmicas. Esto sugiere que la especificidad del reactivo β -Glc-Y por el bloqueo de los AGPs es mucho mayor respecto a la inhibición ubicua de la hidroxilación de los residuos de prolina peptídica en la raíz, para los fenotipos que involucren el proceso de expansión celular (**Tabla 1R**).

Tabla 1R. IC₅₀ obtenidas para cada fenotipo analizado

	Adelantamiento de pelo radical	Expansión de células epidérmicas	Nº de células en ZM	Nº de células en ZE
β -Glc-Y	3,73	4,44	16,79	8,04
DP	129,12	87,23	54,70	4,86
EDHB	198,61	168,65	125,02	271,02

Tabla 1R. Concentraciones inhibitorias 50 por tratamiento con β -Glc-Y; DP o EDHB según se indica en μ M. Para el cálculo de la IC₅₀ se utilizó el gráfico de los valores normalizados respecto al logaritmo en base 10 de la concentración molar de cada reactivo. Se obtuvo la regresión lineal y por interpolación al 50% de inhibición se determinó la concentración IC₅₀ expresada en μ M.

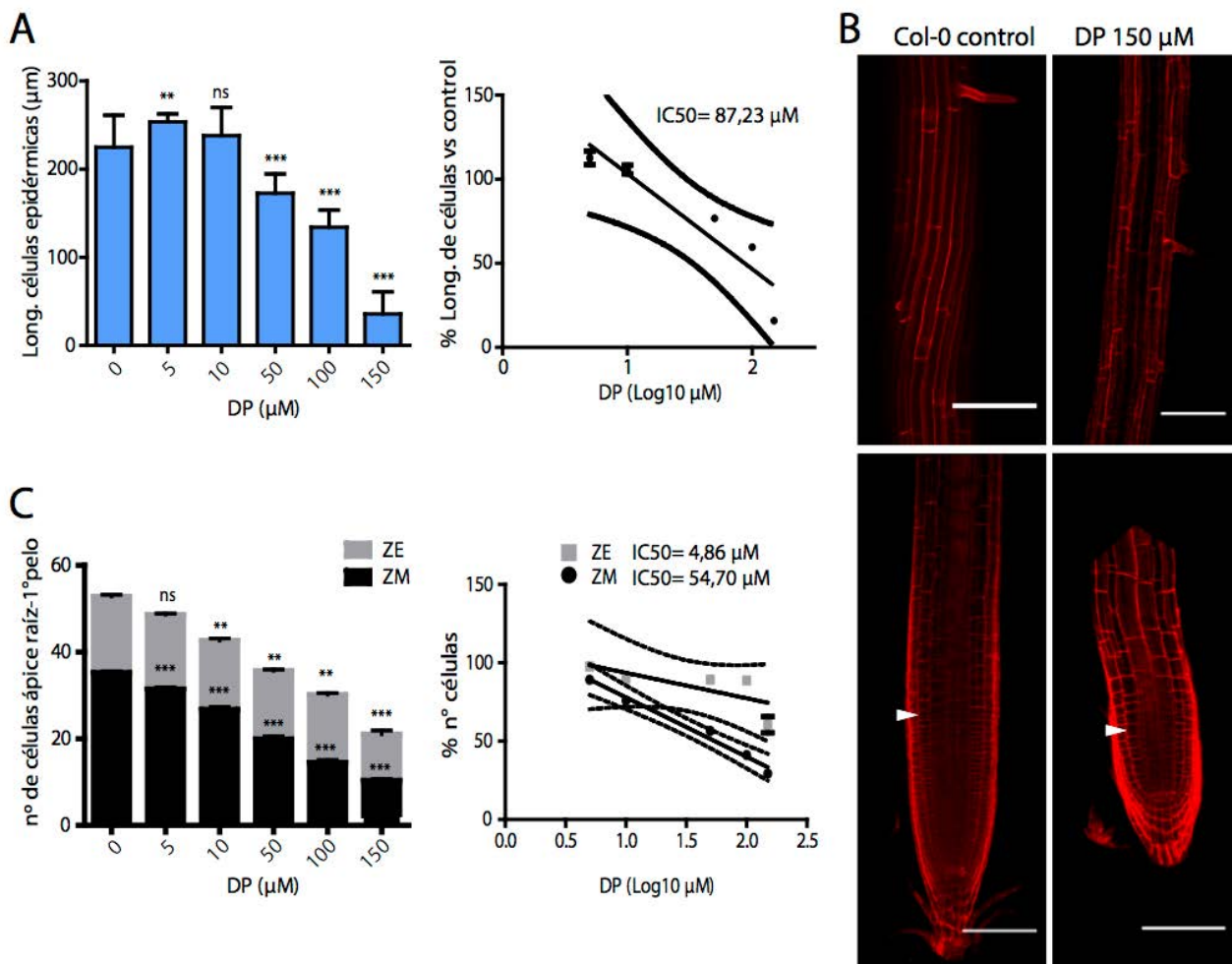


Figura 5R. La inhibición de la hidroxilación de prolina por DP, reduce la expansión y la división celular en las raíces.

A) la longitud de las células epidérmicas disminuye a mayores concentraciones del inhibidor de la hidroxilación de prolina α,α -dipiridil (DP). **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces luego de la tinción con ioduro de propidio de plántulas crecidas durante 7 días en presencia de DP o en condiciones control; Escala 100 μm . Panel superior, células epidérmicas expandidas. Panel inferior, se indica el final del meristema radical (flecha blanca). **C)** el número de células pertenecientes a la zona meristemática (ZM) y a la zona de elongación hasta la aparición del primer pelo (ZE) disminuye a mayores concentraciones del inhibidor DP. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso $n=30$. Los asteriscos indican * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; ns, diferencias no significativas. En las gráficas de regresión lineal (recta negra) se muestran las medias con el error medio respecto al la aparición del pelo radical respecto a la concentración molar de DP y el intervalo de confianza 95% de la regresión lineal (curva negra). Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) las medias fueron normalizadas respecto al control.

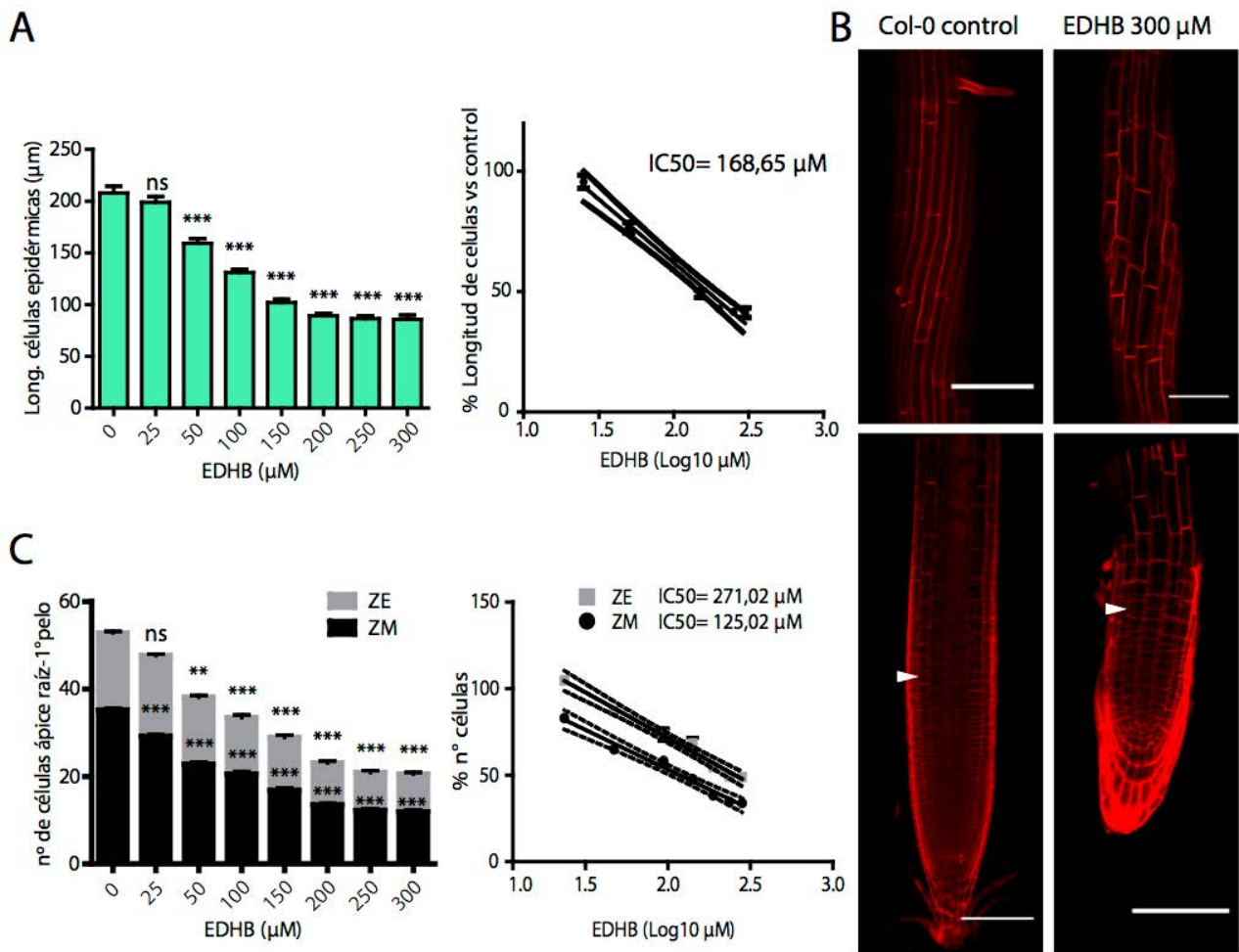


Figura 6R. La inhibición de la hidroxilación de prolínas por EDHB reduce la expansión y la división celular en las raíces.

A) la longitud de las células epidérmicas disminuye a mayores concentraciones del inhibidor competitivo de la hidroxilación de prolínas etil-dihidroxi benzoato (EDHB). **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces luego de la tinción con ioduro de propidio de plántulas crecidas durante 7 días en presencia de EDHB o en condiciones control; Escala 100 μm. Panel superior, células epidérmicas expandidas. Panel inferior, se indica el final del meristema radical (flecha blanca). **C)** el número de células pertenecientes a la zona meristemática (ZM) y a la ZE hasta la aparición del primer pelo (ZE) disminuye a mayores concentraciones del inhibidor EDHB. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas. En las gráficas de regresión lineal (recta negra) se muestran las medias con el error medio respecto al Log10 de la concentración molar de DP y el intervalo de confianza 95% de la regresión lineal (curva negra). Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) las medias fueron normalizadas respecto al control.

4.1.5 Plantas mutantes con deficiente hidroxilación de prolinas presentan mayor diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos.

Las enzimas con actividad P4H de *Arabidopsis* han sido previamente caracterizadas, especialmente los genes que codifican para las P4H5 y P4H2 dado que presentan los mayores niveles de expresión en la raíz y adicionalmente, al observar las proteínas P4H2 y P4H5 fusionadas a reporteros fluorescentes sólo fueron halladas en los pelos radicales (Velasquez, et al., 2011; Velasquez, et al., 2015). En el mismo trabajo se encontraron niveles disminuidos de hidroxiprolina en raíces de plantas *knock out* para los genes de P4H5 y P4H13, y *knock down* para el gen de P4H2 de la triple mutante de T-ADN *p4h2,p4h5,p4h13* (Velasquez et al., 2011). Para establecer si los fenotipos causados por la presencia de los inhibidores enzimáticos de las P4Hs (DP y EDHB) correlacionan con la ausencia de P4Hs mayoritariamente expresadas en la raíz, se analizaron los fenotipos de las plantas *p4h2,p4h5,p4h13*. La deficiente hidroxilación de prolina en plantas *p4h2,p4h5,p4h13* generó un aumento significativo del porcentaje de células epidérmicas que se diferencian como tricoblastos respecto al control WT (Col-0), aunque no presentaron diferencias significativas con WT para la aparición anticipada del primer pelo radical (**Figura 8R**).

Los fenotipos asociados a la aparición del primer pelo radical son consecuencia del número de células presentes en las zonas meristemáticas y de elongación, así como de la longitud máxima de las células epidérmicas expandidas. En las plantas *p4h2,p4h5,p4h13* se observó una leve disminución en la expansión de las células epidérmicas y una reducción únicamente en el número de células meristemáticas respecto a WT. Estos fenotipos leves no lograron impactar de forma significativa en el adelantamiento del primer pelo en *p4h2,p4h5,p4h13* respecto a WT (**Figura 9R**).

La inhibición bioquímica de la hidroxilación de prolinas por DP y EDHB en concentraciones cercanas a 10 μ M, así como la disminución de los niveles de hidroxiprolina en las plantas *p4h2,p4h5,p4h13* no genera deficiencias significativas para el adelantamiento del pelo radical o de los fenotipos asociados de expansión y división celular. Sin embargo, fue observado un mayor porcentaje de células epidérmicas que se diferencian como tricoblastos en *p4h2,p4h5,p4h13*. Esto parece indicar que el mecanismo de diferenciación de las células para desarrollar el pelo radical es más sensible a la falta de hidroxilación de prolinas que el mecanismo subyacente a la expansión y división celulares, asociados a la aparición del primer pelo radical.

4.1.6 El truncado del *O*-arabinogalactano desencadena la diferenciación a tricoblastos, la inhibición de la expansión y la división celular en las raíces.

La enzima (1→6) β-galactosil-transferasa 29A (GALT29A) es responsable de las ramificaciones de (1→6) β-galactosilo en los AGPs (Dilokpimol et al., 2014). El gen *Reduced Arabinose Yariv1* (RAY1) que codifica para una arabinosil-transferasa cuya línea mutante de T-ADN (*ray1*) presenta niveles reducidos de AGP-arabinosilado (Gille et al., 2013) (**Figura 7R**). En las líneas mutantes para la GALT29A (*gt29-1*) y *ray1* homocigotas se observaron los fenotipos de pelos adyacentes, distancia de aparición del primer pelo, expansión y división celulares (**Figura 8R**). Las plantas mutantes *gt29-1* y *ray1* presentaron un mayor porcentaje de células epidérmicas que se diferencian como tricoblastos y una menor distancia de aparición del primer pelo radical, respecto a los respectivos controles WT. Para relacionar ese fenotipo con un defecto en la expansión celular o con alguna deficiencia en la tasa de división celular en la zona meristemática, se analizó la longitud de las células epidérmicas expandidas, y también se contabilizó el número de células de la zona meristemática (ZM) y de la zona de elongación hasta la aparición del primer pelo (ZE) por observación con microscopio confocal, luego de la tinción de las paredes celulares con la sonda fluorescente yoduro de propidio (**Figura 9R**).

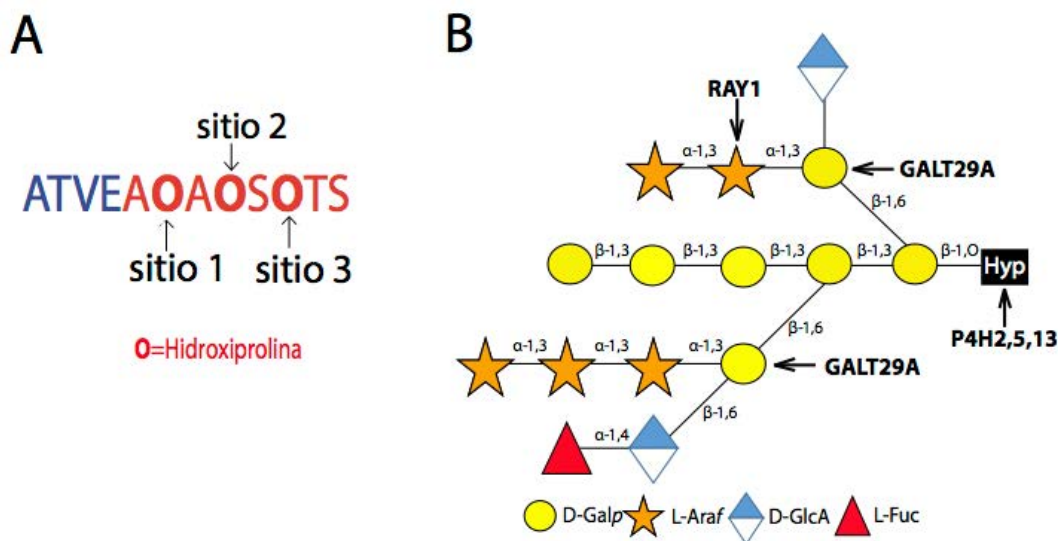


Figura 7R. Motivo peptídico de un AGP y estructura del *O*-arabinogalactano tipo II.

A) Secuencia de residuos de aminoácidos del péptido maduro del AGP21 luego de las modificaciones post-traduccionales de hidroxilación de prolinas, con el código de una letra. Son señalados los tres sitios para la *O*-glicosilación presentes en el motivo característico de los AG péptidos. **B)** Estructura consenso del *O*-arabinogalactano tipo II constituido por una cadena principal de (1→3) β-D-galactopiranososa ramificada con (1→6) β-D-galactopiranososa; y decorada con (1→3) α-L-arabinofuranosa, ácido (1→6) β-D-glucurónico y (1→3) α-L-fucofuranosa. Se indican las uniones glicosídicas y las enzimas que las catalizan, así como la generación de hidroxiprolina (Hyp) por la catálisis de P4H2,5,13 (flechas negras).

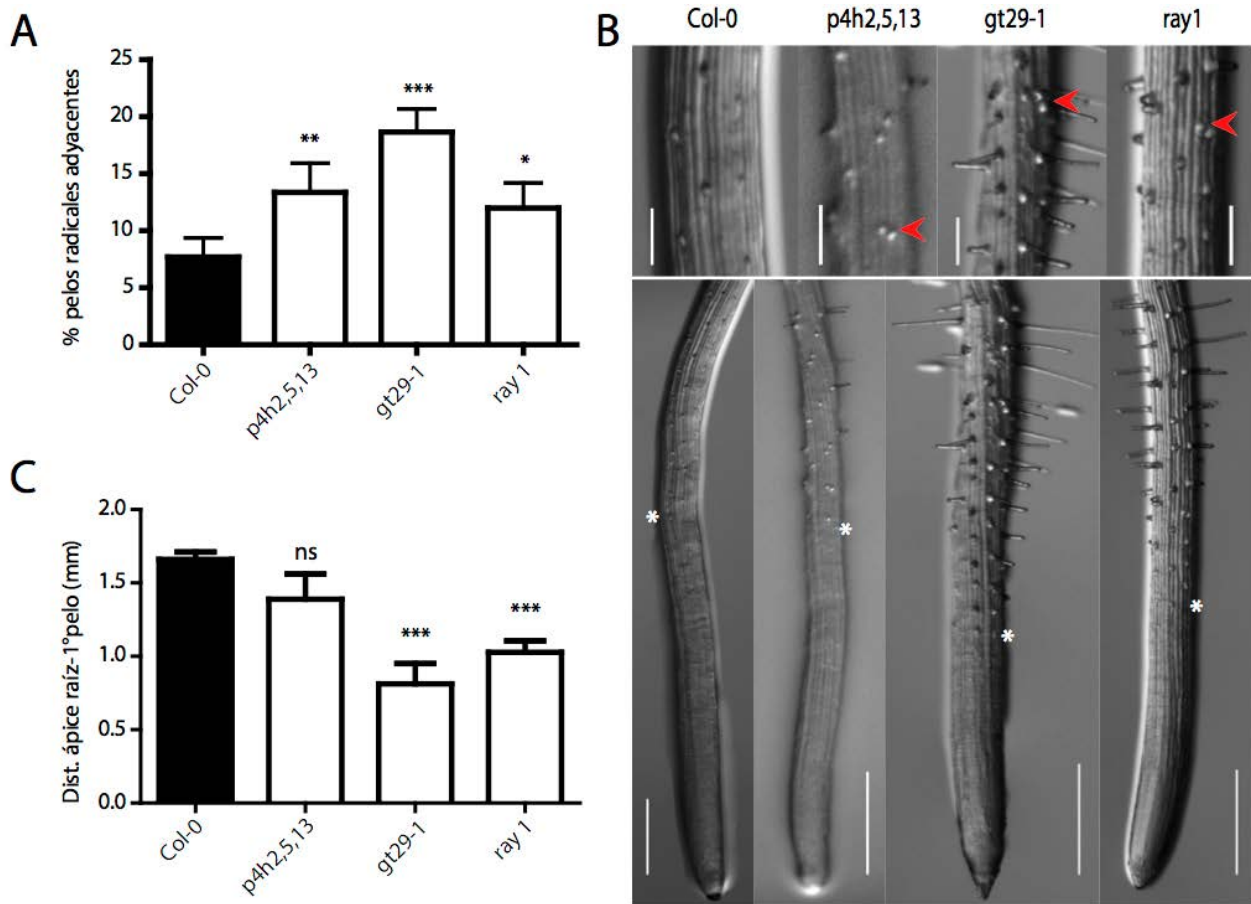


Figura 8R. Plantas mutantes con deficiente hidroxilación de prolínas y *O*-glicosilación presentan mayor diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.

A) el % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas es mayor en plantas triple mutante *p4h2,5,13* de los genes que codifican para las enzimas prolil-hidroxilasas. Así mismo, las mutantes de la $\beta(1\rightarrow6)$ galactosil-transferasa *gt29-1* y arabinosil-transferasa *ray1* específicas de arabinogalactanos presentan un mayor % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas respecto a Col-0. **B)** imágenes de raíces de plántulas mutantes *p4h2,5,13*; *gt29-1*; *ray1* crecidas durante 7 días. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); Escala 100 μ m. Panel inferior, se indica la aparición del primer pelo radical (estrella blanca); Escala 0,5 mm. **C)** la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo es menor en las raíces de las plántulas mutantes *p4h2,5,13*; *gt29-1*; *ray1* respecto a Col-0. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso $n=30$. Los asteriscos indican * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; ns, diferencias no significativas.

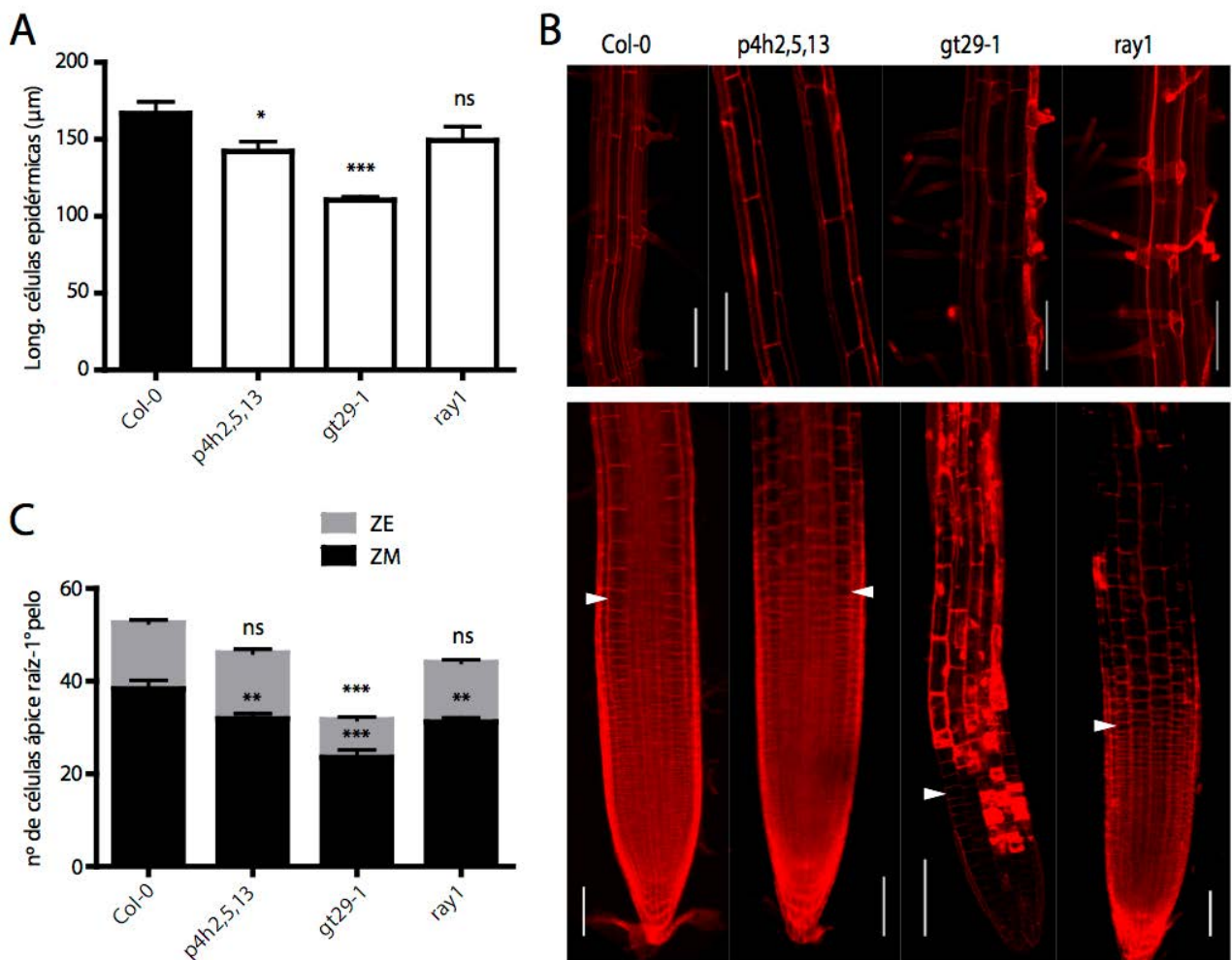


Figura 9R. Plantas mutantes con deficiente hidroxilación de prolinas y O-glicosilación presentan menor expansión y división celular en las raíces.

A) la longitud de las células epidérmicas expandidas es menor en las plántulas mutantes *p4h2,5,13*; *gt29-1* respecto a Col-0. **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces luego de la tinción con yoduro de propidio de plántulas mutantes *p4h2,5,13*; *gt29-1*; *ray1* crecidas durante 7 días; Escala 100 μm. Panel superior, células epidérmicas expandidas. Panel inferior, se indica el final del meristema radical (flecha blanca). **C)** el número de células pertenecientes a la zona meristemática (ZM) es menor en las mutantes *p4h2,5,13*; *gt29-1*; *ray1*. El número de células en la ZE hasta la aparición del primer pelo (ZE) es menor en la mutante *gt29-1*. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas.

4.2 EL AGP21 ES UN AG PÉPTIDO IMPORTANTE PARA EL DESTINO TRICOBLASTO EN LA RAÍZ

El *O*-arabinogalactano constituye más del 90% de la masa total de los AGPs (Kitazawa et al., 2013; Seifert&Roberts, 2007). Lo cual, sugiere que el *O*-arabinogalactano puede ser importante para la función biológica de un AGP maduro, sobre todo para los denominados AG péptidos en que el motivo peptídico AGP consiste en 10 a 15 residuos de aminoácidos únicamente. El decorado con diferentes carbohidratos de la estructura consenso de los arabinogalactanos es la base para la heterogeneidad propuesta dentro de la familia de los AGPs. La familia de los AGPs en la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* esta formada por más de 40 genes, de los cuales 13 codifican para AG péptidos (Gaspar, et al., 2001) (**Figura 4I**).

Partiendo del objetivo general de esta Tesis que busca determinar el rol biológico de un único *O*-arabinogalactano asociado a un AGP se decidió utilizar los AG péptidos como modelos de trabajo, ya que no presentan dominios proteicos adicionales. El motivo del tipo AGP más representativo consiste en el hexapéptido con la secuencia: Ala-Pro-Ala-Pro-Ser-Pro (APAPSP) en el que los residuos de prolina se encuentran dispuestos de forma no-contigua. En todos los AG péptidos los residuos de prolina son hidroxilados (Matsuoka K, et al., 2003; Schultz et al., 2004; Shimizu M, et al., 2005), y luego por la acción secuencial de las glicosil-transferasas es sintetizado el *O*-arabinogalactano del tipo II. Además todos los AG péptidos son secretados y es posible que permanezcan unidos a la membrana plasmática celular por la presencia de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI), la cual puede ser eliminada por acción de fosfolipasas (Wang X, 2002; Wang X, 2005; Schultz et al., 2004).

4.2.1 Los AGPs son expresados en diferentes etapas del desarrollo de la raíz.

La expresión relativa de los 31 genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para AGPs clásicos fue analizada con la herramienta *Meta Analyzer* de la base de datos de Genevestigator. A su vez, a partir de los datos de RNAseq de las plantas en distintas etapas de crecimiento se filtraron los datos correspondientes a las plántulas crecidas entre 7 y 10 días y se generó un mapa de expresión para los 31 AGP clásicos. Las abundancias de los transcritos de los AG péptidos cuantificados por estas técnicas no parecen ser similares en esta etapa de crecimiento para las plántulas (**Figura 10R-A**).

Es interesante observar que, los AG péptidos con el patrón de expresión específico para la ZE de la raíz (AGP24, AGP12, AGP21, AGP13, AGP14) son agrupados en un análisis filogenético conjunto de la familia de AGPs de *Oriza sativa* (arroz) y de *Arabidopsis thaliana* (Ma H et al., 2010).

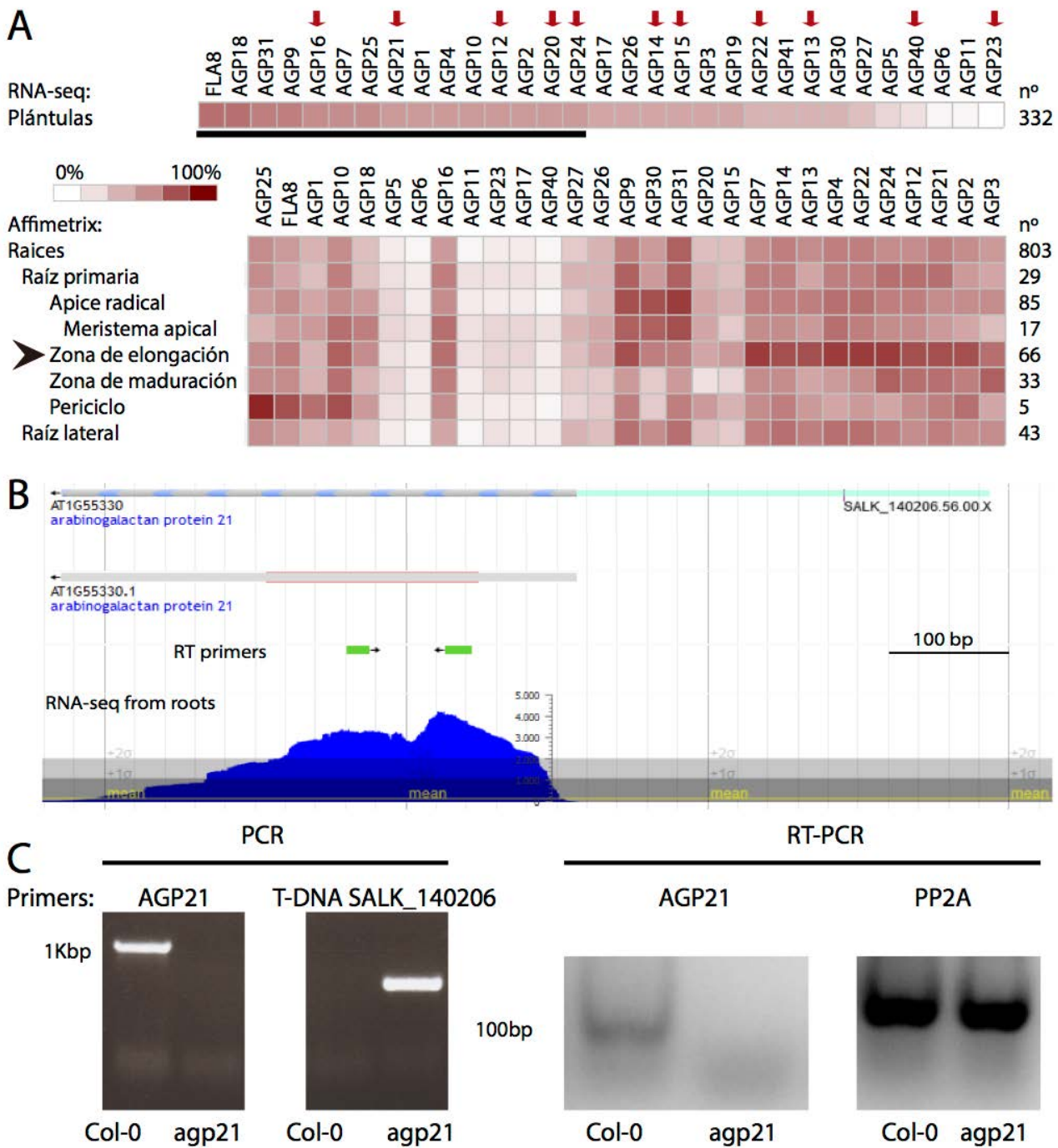


Figura 10R. El AGP21 se encuentra entre los AG péptidos más expresados en plántulas y que son determinantes en la zona de elongación radical.

A Panel superior, abundancia de los ARN mensajeros de todos los AGPs de *Arabidopsis thaliana* en plántulas crecidas durante 7 días (RNaseq), los AG péptidos se indican con flechas rojas. **A** panel inferior, abundancia de los ARN mensajeros de todos los AGPs de *Arabidopsis thaliana* en los tejidos en desarrollo de la raíz (Affimetrix), los AG péptidos específicos de las zonas de elongación y de maduración se indican con flechas rojas (Genevestigator). **B**) Mapa del gen AT1G55330 que codifica para el AG péptido AGP21. Se indica el sitio estimado del transposón inserto a 300 pares de bases río arriba del sitio +1 de inicio de la transcripción del gen de AGP21 (SALK_140206). El transcripto de AGP21 consiste en un único exón con sus extremos 5'UTR y 3'UTR. Los primers diseñados para la cuantificación de los niveles de transcripto de AGP21 se aparean en las zonas correspondientes a la escala del mapa (cajas verdes). **C**) PCR para la línea mutante insercional de T-DNA SALK_140206. RT-PCR para el transcripto del gen AGP21 en raíces de la línea mutante *agp21* y de Col-0, junto con la RT-PCR para el transcripto del gen de la fosfatasa 2 (PP2A) como control de la expresión general.

4.2.2 La falta de ciertos AG péptidos promueve la diferenciación de las células epidérmicas a tricoblastos en la raíz.

En una búsqueda inicial de los genes que codifican para AGPs clásicos, se observaron los fenotipos de diferenciación de las células epidérmicas a pelo radical y de aparición del primer pelo radical en líneas mutantes de T-DNA correspondientes a diferentes AGPs. Entre los cuales, se encontraron como relevantes para el correcta diferenciación de las células epidérmicas a pelo radical, los genes que codifican para AGP15 (AT5G1740), AGP20 (AT3G61640) y AGP21 (AT1G55330).

El fenotipo de alteración para la diferenciación de las células epidérmicas a pelo radical, así como una menor distancia desde el ápice hasta la aparición del primer pelo se encontró en las plantas mutantes de los insertos: WiscDsLox383F8 (*agp15.1*); SALK_114736S (*agp15.2*); SALK_092212C (*agp20.1*); SAIL_849_C06 (*agp20.2*); SALK_140206 (*agp21*) (**Tabla 1M**). La mutante de T-DNA SALK_140206 correspondiente al gen AT1G55330 que codifica para el AGP 21 (*agp21*) presenta el fenotipo de mayor alteración para la diferenciación de las células epidérmicas a pelo radical, por ello se decidió generar las cruzas de las mutantes *agp15.2* y *agp20.1* con la mutante *agp21* para determinar si existe un efecto aditivo en los fenotipos observados a causa de la falta de dos AGPs. Las plantas doble mutantes *agp15.2,agp21* y *agp20.1,agp21* no produjeron fenotipos aditivos respecto a la simple mutante *agp21*, lo que sugiere un efecto redundante para los fenotipos observados entre los AGPs indicados. En *agp21* se observó el mayor adelantamiento en la aparición de lo primer pelo radical, evidenciada por la menor distancia desde el ápice de la raíz hasta el primer pelo, respecto a WT (**Figura 11R**).

El programa de diferenciación celular que establece la identidad de una célula epidérmica como tricoblasto (que desarrollará pelo) o como atricoblasto (que no formará pelo) tiene lugar en las zona de maduración de la raíz. El fenotipo de pelos radicales en células epidérmicas adyacentes sugiere que el programa de diferenciación para definir un tricoblasto es alterado en las raíces de *agp15.2*; *agp20.1* y *agp21*. La necesidad de ciertos AGPs para el establecimiento normal del programa de diferenciación del tricoblasto, es consistente con el efecto observado de aumento de la diferenciación de la epidermis a pelo radical a causa del bloqueo específico de los AGPs por el reactivo de β -Glc-Y (**Figura 1R y Figura 11R**).

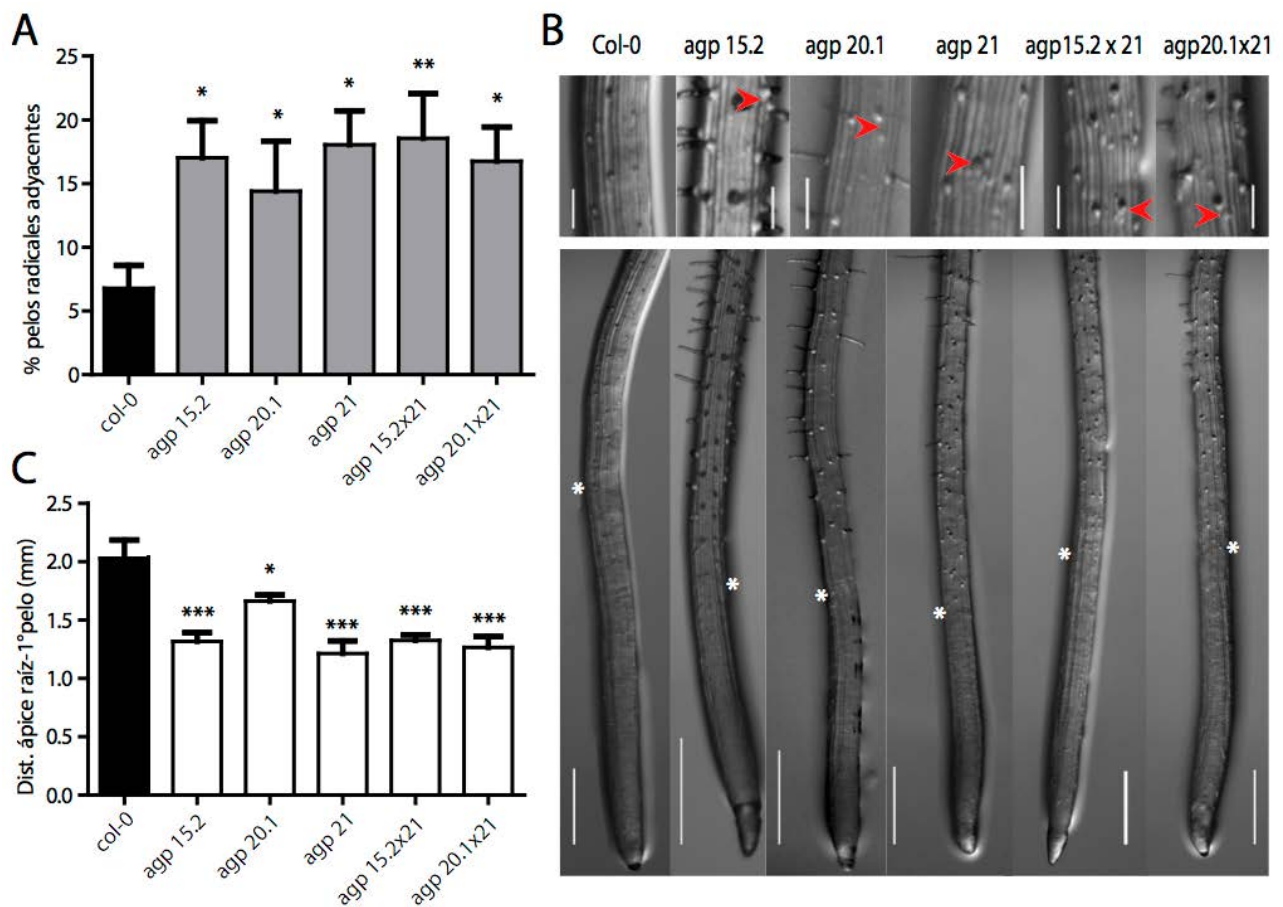


Figura 11R. Los péptidos AGP21, AGP15 y AGP20 participan en la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.

A) el % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas es mayor en las plantas mutantes *agp15*; *agp20* y *agp21* respecto al control Col-0. Sin embargo, las dobles de las mutantes *agp15,agp21* y *agp20,agp21* no presentan un fenotipo de mayor % de pelos radicales adyacentes respecto a la simple mutante *agp21*. **B)** imágenes de raíces de plántulas mutantes *agp15*; *agp20*; *agp21*; *agp15xagp21*; *agp20xagp21* crecidas durante 7 días. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); Escala 100 μ m. Panel inferior, se indica la aparición del primer pelo radical (estrella blanca); Escala 0,5 mm. **C)** la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo es menor en las raíces de las plántulas mutantes *agp15*; *agp20*; *agp21* y en las dobles mutantes *agp15,agp21*; *agp20,agp21* respecto a Col-0. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas.

4.2.3 Los AG péptidos AGP15 y AGP21 participan del proceso de expansión y división celular en las raíces.

La formación del primer pelo radical en forma adelantada observada en plantas *agp15.2* y *agp21* son consecuencia del número de células reducido correspondientes a las zonas meristemáticas y de elongación en las raíces. La longitud máxima de las células epidérmicas expandidas en las plantas *agp15.2* y *agp21* es menor respecto al control WT. El defecto en el proceso de expansión de las células epidérmicas junto a la reducción en el número de células meristemáticas y de elongación fundamentan el adelantamiento del primer pelo observado en las plantas *agp15.2* y *agp21*. En cambio, en las plantas *agp20.1* la expansión celular es normal y el número de celular aunque menor no es significativo respecto al WT, resultando un fenotipo de adelantamiento del pelo radical muy sutil (**Figura 12R**).

El bloqueo de los epítopes de AGPs en la raíz por tratamiento con β -Glc-Y produjo una alteración en el programa de diferenciación normal de las células epidérmicas, promoviendo la diferenciación a pelo radical en células que no producirían pelo. Adicionalmente, el bloqueo específico de los AGPs promueve el adelantamiento del programa de diferenciación a pelo radical respecto al número de células desde la zona meristemática en que emerge el primer pelo radical (**Figuras 1R y 2R**). En base a esto, es lógico que los genes que codifican para AGPs relevantes en la diferenciación de las células epidérmicas a pelo radical, se distingan por presentar altos niveles de expresión en las ZE y de maduración de la raíz, y a su vez, altos niveles de expresión en la misma etapa de crecimiento de las plantas.

En este trabajo nos concentraremos en el estudio del gen que codifica para el AG péptido AGP21, dado que presenta altos niveles de expresión y ha resultado ser relevante para el establecimiento normal de los pelos radicales, asociado al proceso de expansión y división celular en la raíz de *Arabidopsis*. Las plantas *agp21* mutantes homocigotas para el T-ADN SALK_140206 son además, mutantes *knock out* dada la ausencia de ADNc amplificado por RT-PCR con *primers* específicos para los transcritos de AGP21 (**Figura 10R**).

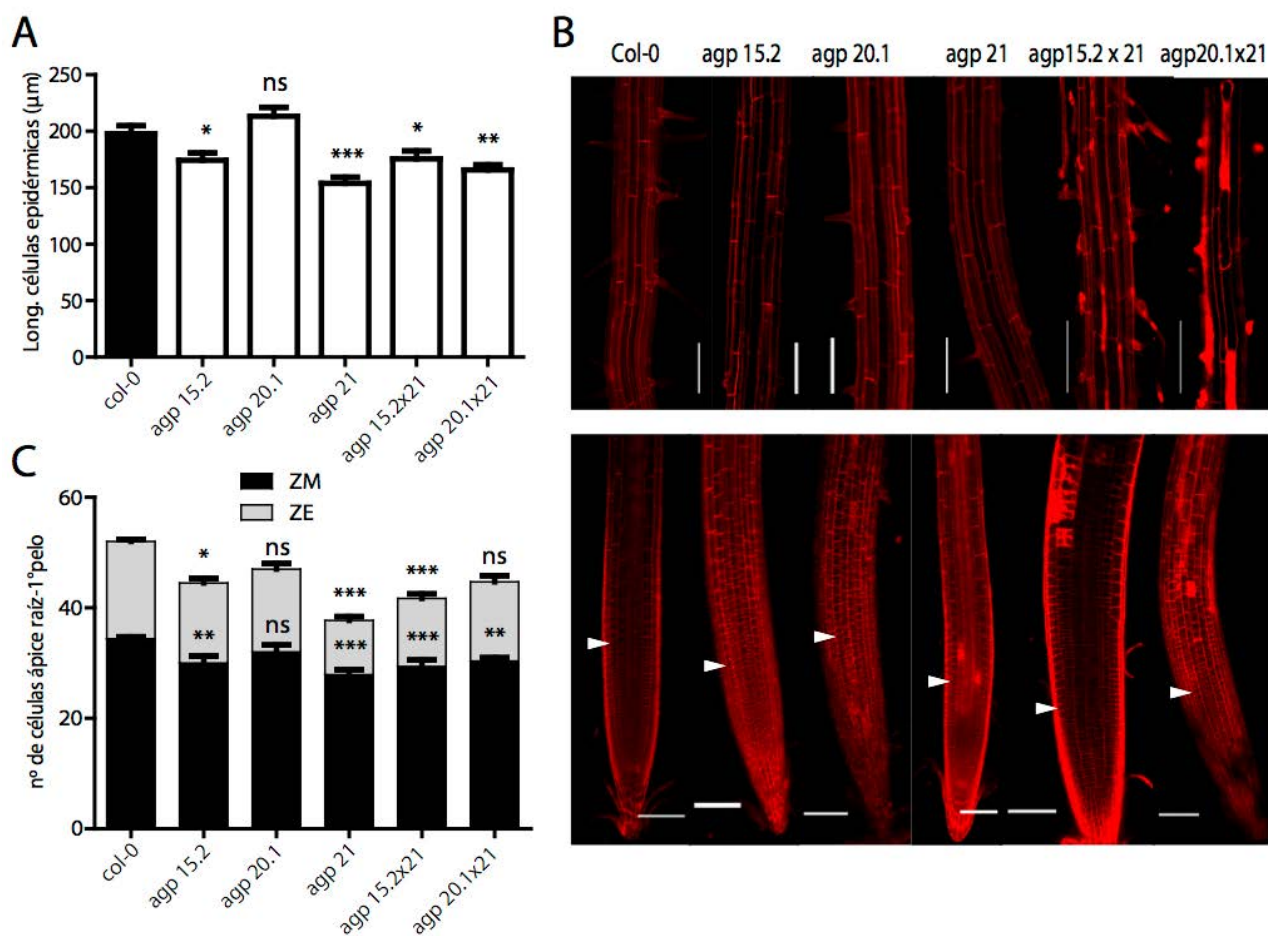


Figura 12R. Los AG péptidos AGP15 y AGP21 participan del proceso de expansión y división celular en las raíces.

A) la longitud de las células epidérmicas expandidas es menor en las plántulas mutante *agp15* respecto a Col-0. Sin embargo, la doble mutante *agp15,agp21* no presenta un fenotipo de mayor % de pelos radicales adyacentes respecto a las respectivas simples mutantes. **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces luego de la tinción con yoduro de propidio de plántulas mutantes *agp15*; *agp20*; *agp21*; *agp15,agp21*; *agp20,agp21* crecidas durante 7 días; Escala 100 μm. Panel superior, células epidérmicas expandidas. Panel inferior, se indica el final del meristema radical (flecha blanca). **C)** el número de células pertenecientes a la zona meristemática (ZM) y a la zona de elongación hasta la aparición del primer pelo (ZE) es menor en las plántulas mutantes *agp15* y *agp21*, respecto a Col-0. Sin embargo, la doble mutante *agp15,agp21* no presenta un fenotipo aditivo de menor número de células en ZM y ZE, respecto a las simples mutantes. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas.

4.2.4 La proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 se encuentra principalmente en las células epidérmicas que desarrollan pelos radicales.

Los resultados que hemos observado hasta aquí indican que los AGPs parecen cumplir un rol importante en el destino celular de tricoblasto para la formación del pelo radical. En los objetivos específicos de esta Tesis se ha propuesto “Estudiar el rol biológico del AGP21 en el desarrollo de la raíz” y “Determinar el impacto de la *O*-arabinogalactosilación en el rol del AGP21”. Por ello han sido considerados los AG péptidos ya que constan únicamente de un *backbone* proteico de 10 a 13 aminoácidos, *O*-arabinogalactosilados en los tres residuos de hidroxiprolina del motivo AGP. Salvo el ancla de GPI, en los AG péptidos no existe ningún dominio proteico adicional al motivo de AGP *O*-glicosilado, que pueda asociarse con una función biológica. El resto de los integrantes de la familia AGPs no cumple con esa característica. Los AGPs clásicos contienen largos dominios ricos en prolina dispuesta de forma contigua (motivo AGP) o no contigua (motivo EXT, o híbridos); y a su vez, pueden incluir dominios del tipo Fasciclina (FLAs), dominios ricos en lisina (AGP Lys-rich). Los AGPs que no están anclados a membrana plasmática por GPI son considerados como no-clásicos, y además incluyen dominios ricos en asparagina (AGP Asn-rich), cuya presencia dificultaría la asignación de un rol biológico para el *O*-arabinogalactano (**Figura 4I**).

Las plantas mutantes *agp21* fueron las que presentaron los fenotipos de mayor alteración en el destino celular de tricoblasto para la formación del pelo radical. El AGP21 es el AG péptido que presenta un perfil de expresión mayoritario para la ZE de la raíz y dentro de ese grupo, AGP21 es el más expresado en plántulas. La secuencia de aminoácidos del péptido maduro AGP21 es ATVEAPAPSPTS. Adicionalmente, se confirmó que las tres Pro (Pro=P) en el péptido AGP21 maduro son hidroxiladas a Hyp (Hyp = O) y luego de la *O*-glicosilación el péptido es clivado en un sitio omega para el agregado de un ancla de GPI (Schultz et al., 2004). Es interesante observar que el AGP21 está altamente expresado en raíces WT, dado que sus transcritos son más de tres veces abundantes respecto a la media de expresión de los genes de *Arabidopsis thaliana*¹ (**Figura 10R-B**). Se decidió utilizar AGP21 como glicoproteína modelo para el estudio del rol biológico del Arabinogalactano del tipo II en el programa de desarrollo de la raíz.

A partir del clonado de la región promotora de 1,5 Kbp río arriba del sitio de iniciación de la transcripción del gen que codifica para AGP21 y de la construcción sintética del AGP21 fusionado a la proteína fluorescente Venus (véase Materiales y Métodos 3.5.1), se transformaron plantas mutantes *agp21*. Se obtuvieron dos líneas transgénicas independientes de plantas que expresan la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 bajo la expresión del promotor endógeno de AGP21 (*agp21/AGP21p::V-AGP21*). Las líneas con el transgen *AGP21p::V-AGP21* en homocigosis fueron crecidas en condiciones de control, y al cabo de 7 días las raíces fueron observadas al microscopio confocal.

¹ https://apps.araport.org/jbrowse/?data=arabidopsis&loc=Chr1%3A20648409..20648912&tracks=Araport11_Loci%2CAraport11_gene_models%2Croot_tophat&highlight=

Se pudo determinar que V-AGP21 se localiza en las células epidérmicas que tienen un destino de tricoblasto en la ZE de la raíz. (Figura 13-R).

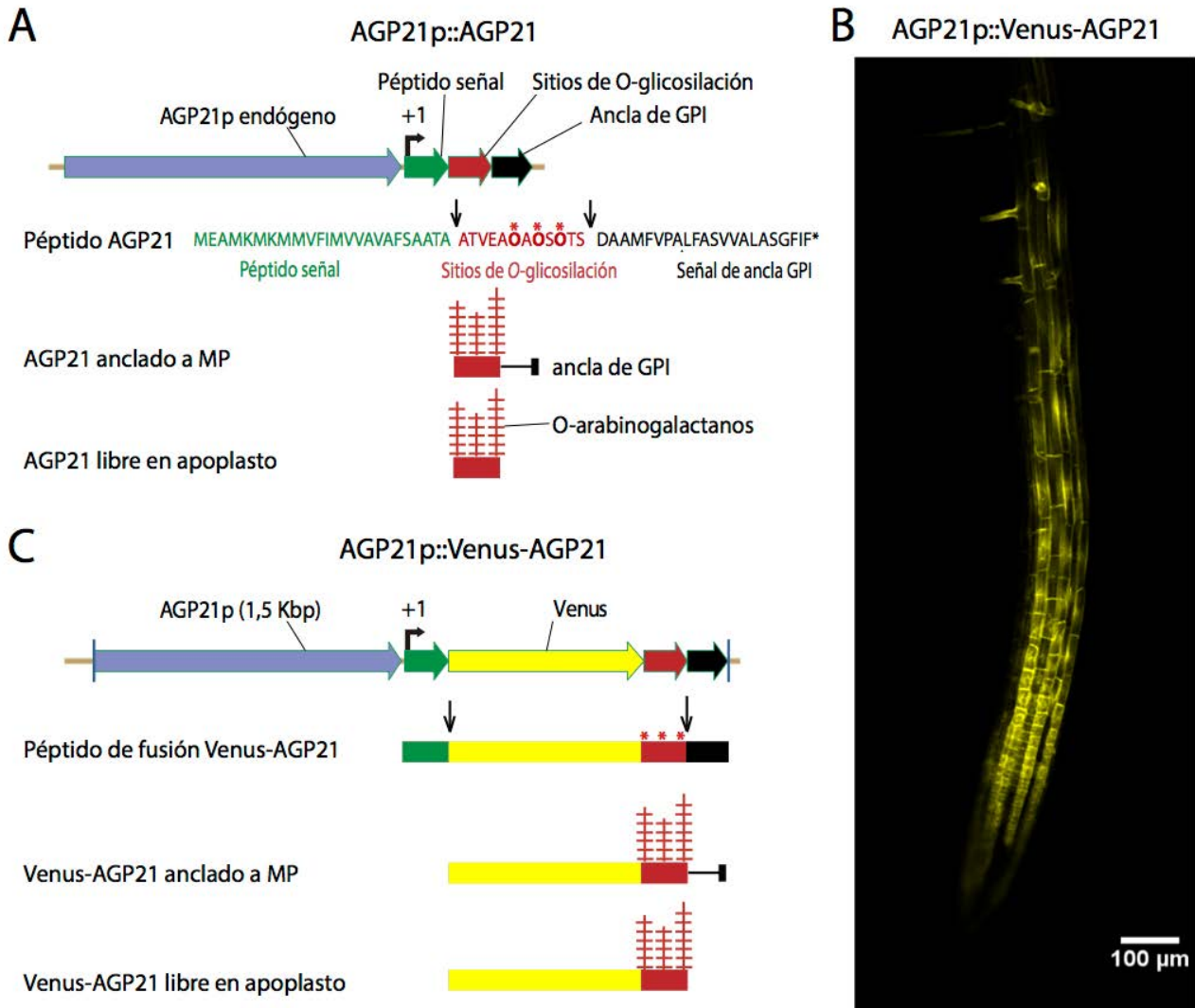


Figura 13R. La proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 se encuentra principalmente en las células epidérmicas que desarrollan pelos radicales.

A) esquema del gen AT1G55330 que codifica para AGP21. Una vez traducido AGP21 consta de un péptido señal de secreción (secuencia verde), un motivo AGP (secuencia roja, los asteriscos indican los sitios de la O-glicosilación) y un péptido que codifica para una ancla de glicosilfosfatidil-inositol (GPI, secuencia negra). El péptido AGP21 es liberado de la señal de secreción y, eventualmente por acción de FosfolipasaC) es liberado del ancla de GPI (flechas negras) resultando un péptido de 12 residuos de aminoácidos. **B)** imagen de microscopía confocal de raíz de una planta que expresa la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 donde se observa la localización de AGP21 en las células epidérmicas que desarrollan el pelo radical, las cuales generan los pelos radicales. Planta crecida durante 7 días, Escala 100 µm. **C)** esquema de la construcción clonada para la expresión de la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 bajo el control de la región promotora del gen AGP21 (1,5 Kbp río arriba del sitio +1 de inicio de la transcripción).

4.2.5 El AGP21 regula el destino celular en la epidermis de las raíces.

Al restablecer la expresión del péptido AGP21 bajo el control de 1,5 Kbp de su región promotora endógena, en plantas mutantes *agp21* (*agp21/AGP21p::V-AGP21*), se observó la complementación de los fenotipos a niveles similares a los encontrados para el WT. Se midieron los porcentaje de pelo radical adyacente y de la distancia de la formación del primer pelo en la raíz. De forma similar, al sobreexpresar la proteína de fusión Venus-AGP21 bajo el control del promotor constitutivo 35S en plantas mutantes *agp21* (*agp21/35-Sp::V-AGP21*) se observaron fenotipos similares al WT (**Figura 14R**). Es posible que los niveles endógenos de AGP21 en la raíz sean lo suficientemente elevados como para que la sobreexpresión en las plantas 35-Sp::V-AGP21 no produzca un fenotipo exacerbado de menor porcentaje de pelos radicales adyacentes o una posterior aparición del primer pelo radical, respecto al WT.

En las plantas *agp21* la distancia en que se observó el primer pelo radical es restaurado a los valores del WT luego de la complementación de la expresión del AGP21, ya sea en las líneas con promotor endógeno o con el promotor constitutivo 35-S. La restauración del AGP21 con promotor endógeno (*AGP21p::AGP21*) complementa el fenotipo WT de número de celular pero llamativamente, produjo una mayor expansión de las células epidérmicas en la raíz (**Figura 15R**). La sobreexpresión del AGP21 (*35-Sp::AGP21*) no logró complementar en forma total el número de células de la zona meristemática y de elongación, en comparación con el WT. Sin embargo, la línea sobreexpresante de AGP21 complementó el fenotipo de aparición del primer pelo radical a los valores del WT.

Las plantas sobreexpresantes de AGP21 (*35-Sp::Venus-AGP21*) no presentaron fenotipos anormales para la presencia de pelos en células epidérmicas adyacentes o de adelantamiento del primer pelo radical. El efecto de sobreexpresar AGP21 de forma constitutiva resultó en un menor número de células de las zonas meristemática y de elongación en las raíces respecto a WT, aunque en mayor número de células que las descritas para la mutante *agp21* (**Figura 15R-C**).

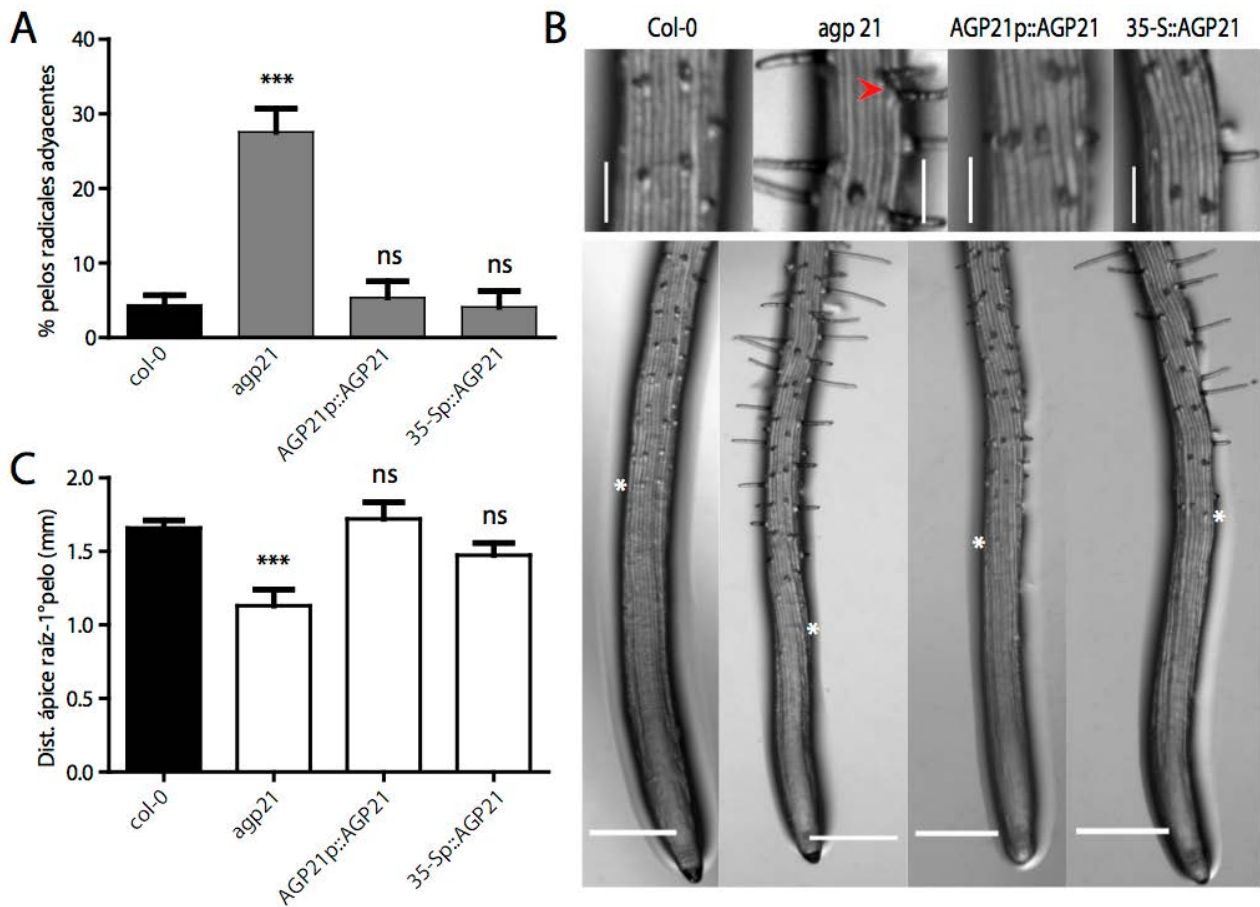


Figura 14R. El péptido AGP21 es determinante para la diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos en las raíces.

A) el % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas es mayor en plantas mutantes *agp21*, mientras que las plantas *agp21* complementadas con el promotor endógeno de AGP21 (*agp21/AGP21p::AGP21*) rescataron el fenotipo Col-0 *wild type*. **B)** imágenes de raíces de plántulas mutantes *agp21*; *agp21/AGP21p::AGP21*; *Col-0/35-Sp::AGP21* crecidas durante 7 días. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); Escala 100 μ m. Panel inferior, se indica la aparición del primer pelo radical (estrella blanca); Escala 0,5 mm. **C)** la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo es menor en las raíces de las plántulas mutantes *agp21* respecto a Col-0. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns, diferencias no significativas.

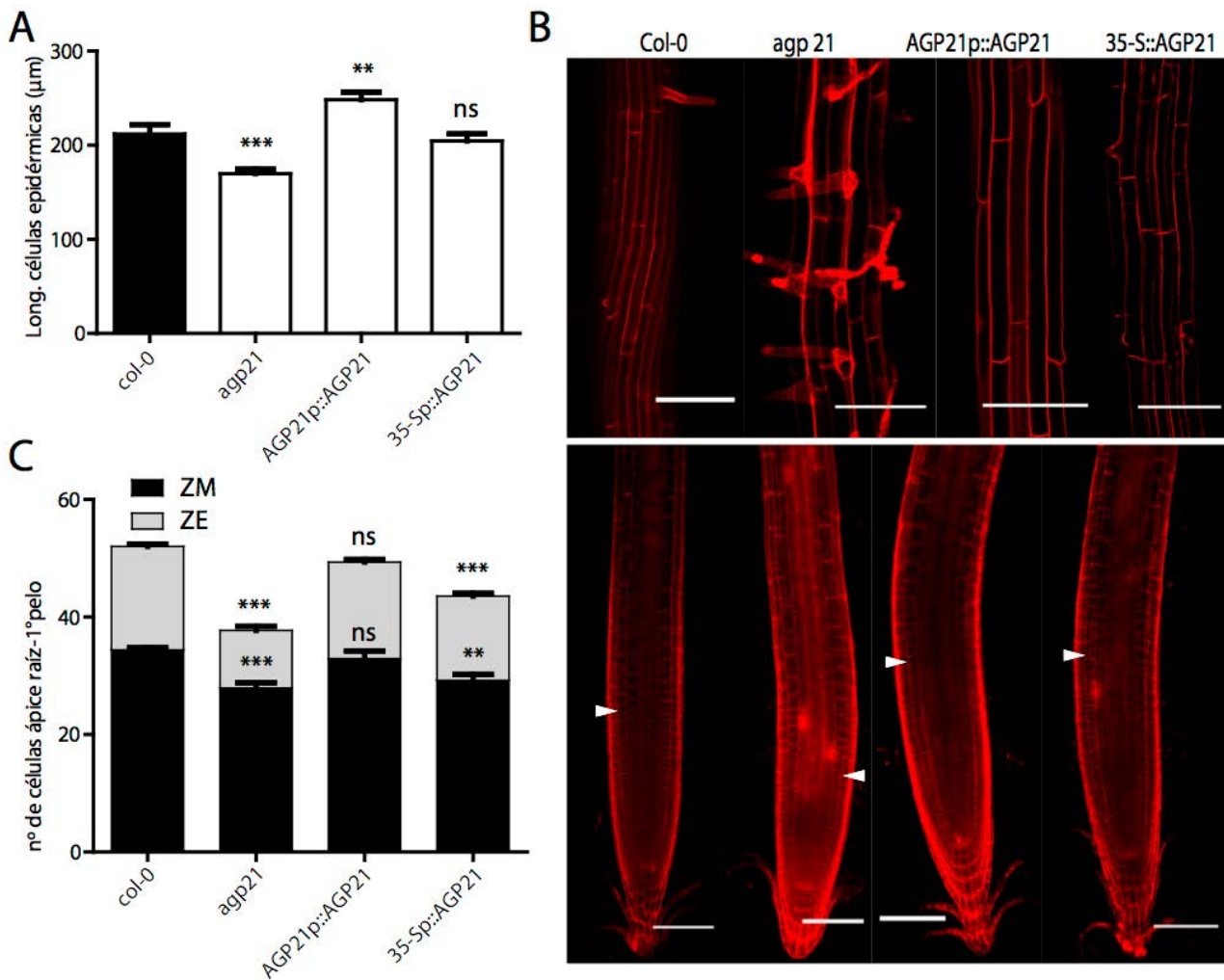


Figura 15R. El péptido AGP21 participa en la expansión y la división celular en las raíces.

A) en plántulas mutantes *agp21* la longitud de las células epidérmicas expandidas es menor respecto a Col-0, mientras que las plantas *agp21* complementadas con el promotor endógeno de AGP21 (*agp21/AGP21p::AGP21*) rescataron el fenotipo Col-0 *wild type*. **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces luego de la tinción con ioduro de propidio de plántulas mutantes *agp21*; *agp21/AGP21p::AGP21*; Col-0/*35-Sp::AGP21* crecidas durante 7 días; Escala 100 μm. Panel superior, células epidérmicas expandidas. Panel inferior, se indica el final del meristema radical (flecha blanca). **C)** el número de células pertenecientes a la zona meristemática (ZM) y a la zona de elongación hasta la aparición del primer pelo (ZE) es menor en las plántulas mutantes *agp21*, respecto a Col-0. El número de células tanto para el ZM como en el ZE fue complementado en las plántulas *agp21/AGP21p::AGP21*, aunque la sobre-expresión de AGP21 no resulta en un aumento del número de células. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas.

4.2.6 La proteína de fusión Venus-AGP21 se expresa en forma ubicua.

Las abundancias de los transcritos de los AG péptidos analizadas a partir de la base de datos Genevestigator (Figura 12R-A) pudieron ser corroboradas para el AGP21 mediante la observación de la expresión de AGP21 fusionado a una proteína fluorescente bajo la regulación de la expresión del propio promotor endógeno (AGP21p::V-AGP21). En *Arabidopsis thaliana* el AGP21 se encuentra expresado en el mesófilo de las hojas y en los tricomas; también fue observado en las células de la epidermis del hipocotilo crecido en presencia de luz (Figura 16R). Previamente se describió la expresión de AGP21 en las células tricoblastos de la epidermis de la raíz (Figura 13R-B). Adicionalmente, el AGP21 se encontró expresado en las etapas iniciales de la formación de los pelos radicales (Figura 16R).

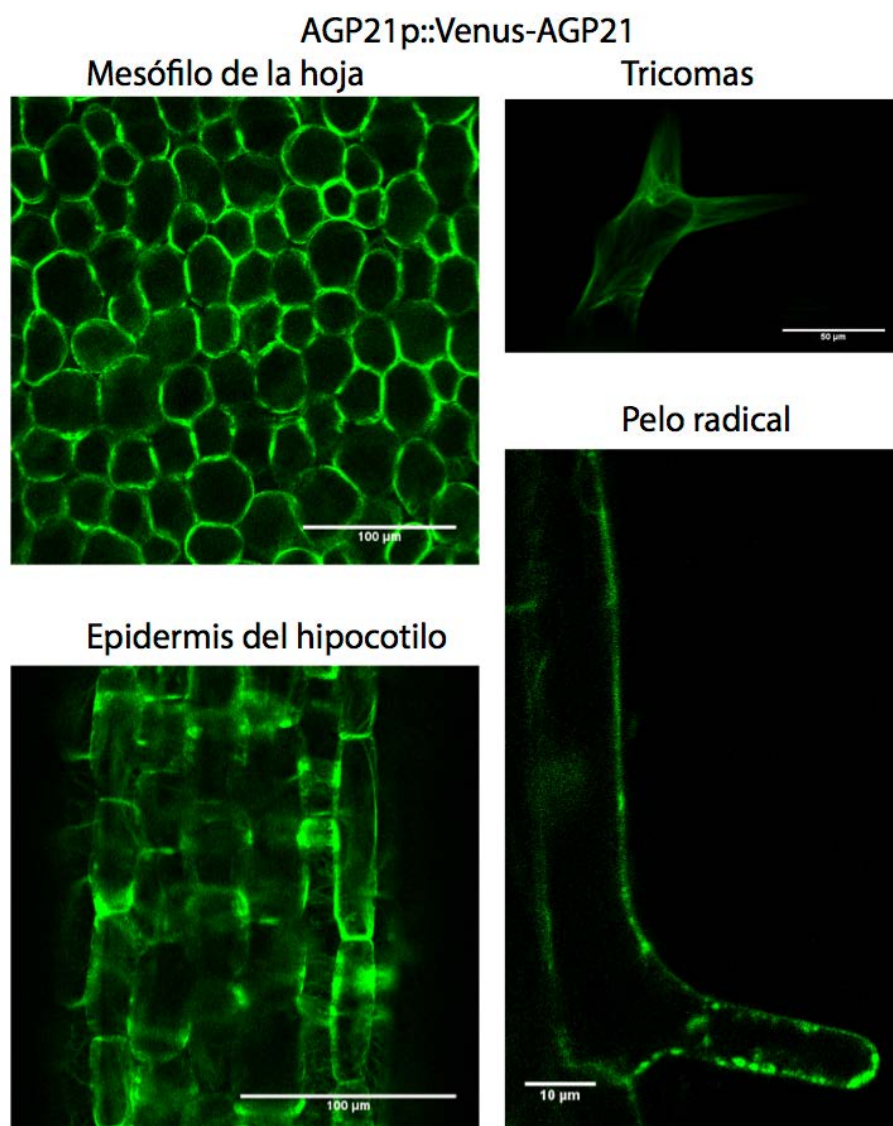


Figura 16R. La proteína AGP21 se encuentra ubicuamente en *Arabidopsis thaliana*.

Imágenes de microscopía confocal de plántulas que expresan la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21. Se observa la presencia de AGP21 (verde) en las células epidérmicas deL mesófilo de las primeras hojas (Escala 100 μm), de tricomas de las primeras hojas (Escala 10 μm), de la epidermis del hipocotilo (Escala 100 μm) y del pelo radical (Escala 10 μm). Todas las plantas fueron crecidas durante 7 días.

4.2.7 AGP21 estaría *O*-glicosilado y posiblemente unido a la membrana plasmática.

La *O*-glicosilación en el péptido AGP21 podría ser crucial para su rol biológico, mientras que el AG péptido actuaría como un andamiaje proteico. El AGP21 sería secretado a la membrana plasmática y eventualmente al espacio apoplástico. En un estudio previo, fue detectado que las tres unidades de prolina son hidroxiladas en el oligopéptido (ATVEAPAPSPTS es convertido a ATVEAOAOSOTS) correspondiente al péptido maduro de AGP21, mediante espectrometría de masas (Schultz et al., 2004). Por lo tanto, el siguiente paso fue el análisis del estado de *O*-glicosilación del AGP21 al ser expresado en las células de la raíz.

A partir de los extractos proteicos de raíces totales provenientes de plantas sobreexpresantes de Venus-AGP21 (35-Sp::V-AGP21) se realizó la corrida electroforética en un gel desnaturalizante para proteínas y se determinó por *western blot* con anticuerpos primarios anti-GFP el peso molecular aparente de la glicoproteína de fusión Venus-AGP21. La banda revelada de mayor intensidad presenta un peso molecular de alrededor de 100-120 kDa que correspondería a V-AGP21 posiblemente *O*-glicosilado en sus tres residuos de Hyp. Luego, se observaron dos bandas de menor intensidad correspondientes a un peso molecular de alrededor de 80 y 60 kDa, que corresponderían al AGP21 *O*-glicosilado en dos de los tres residuos de Hyp y en uno de los tres residuos de Hyp, en cada caso (**Figura 17R**). Para la proteína de fusión Venus-AGP21 expresada bajo el control del promotor endógeno (AGP21p::V-AGP21) el *western blot* realizado presentó dos bandas muy intensas, una de 100-110 kDa que podrían asignarse a V-AGP21 *O*-glicosilado en sus tres residuos de Hyp, y una banda de 80 kDa que corresponderían al AGP21 *O*-glicosilado en dos de los tres residuos de Hyp. Las diferencias de peso molecular de 20-25 kDa aproximadamente de cada banda puede interpretarse como el peso molecular aparente de un sitio de *O*-glicosilación del péptido AGP21. De forma similar se detectó la migración electroforética de 30-35 kDa aproximadamente para los sitios individuales *O*-glicosilados para diferentes versiones de-glicosiladas del AGP14, el cual es muy similar en la secuencia proteica a AGP21 (Ogawa-Ohnishi & Matsubayashi 2015), y a diferentes versiones de-glicosiladas de la glicoproteína Xilógeno (un AGP) que contiene dos sitios Hyp en su secuencia (Motose et al., 2004)

El péptido maduro V-AGP21 sin *O*-glicanos debería tener un peso molecular aproximado de 30 kDa, por la presencia de Venus fusionada a la cadena de 12 de aminoácidos del péptido no glicosilado AGP21. Sin embargo en ambas corridas de proteínas fue revelada una banda de 25 kDa de peso molecular que correspondería con la proteína Venus libre generada por auto-hidrólisis y excisión de Venus de la proteína de fusión V-AGP21 (Sun W, et al., 2004; Xu Q, et al., 1999).

En los extractos proteicos provenientes de plantas crecidas en presencia de los inhibidores de P4Hs (EDHB) DP) para observar versiones sub-glicosiladas de V-AGP21 se detectó la banda de 100 kDa, y además, una banda más intensa de 30 kDa que sería Venus-AGP21 sin *O*-glicanos y probablemente con sub-hidroxilación de sus prolinas (resultados no mostrados).

La *O*-glicosilación progresiva del AGP podría presentarse como una población con cierta variabilidad en las estructuras de los *O*-arabinogalactanos asociados, lo que se manifestaría como un “chorreado” del AGP revelado por *western blot*. El hecho de que las bandas en ambos western resulten bien definidas indica que las poblaciones del AGP21 glicosilado contienen estructuras discretas de *O*-arabinogalactano. Es posible que exista un mecanismo de control que impida la síntesis y secreción de estructuras de *O*-arabinogalactano incompletas o sub-glicosiladas, como sucede en el caso de las *N*-glicoproteínas (Di Cola et al., 2005; Lederkremer, 2009; Liebminger et al., 2010; Liu and Howell, 2010).

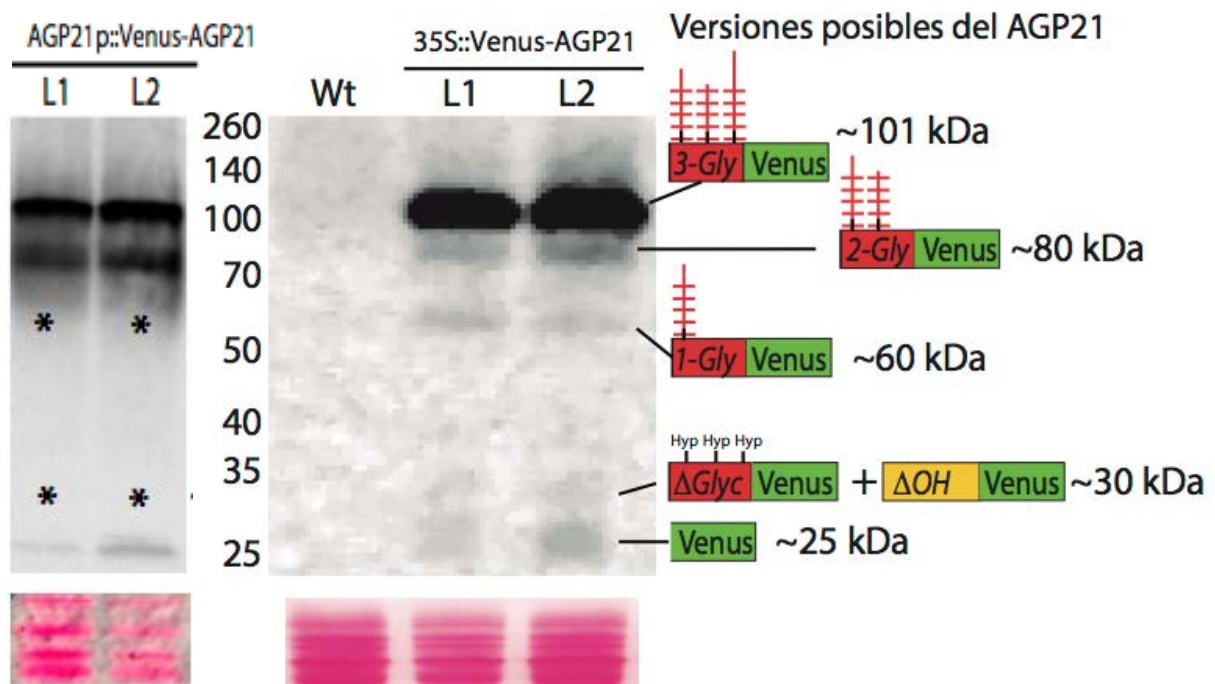


Figura 17R. AGP21 es una glicoproteína de 100 KDa de peso molecular.

Western blot anti GFP de extractos proteicos de raíz provenientes de dos líneas transgénicas independientes de plantas *A. thaliana* sobreexpresantes de la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 bajo el promotor 35-S del virus de mosaico del tabaco. Plantas crecidas durante 7 días en medio control, fotoperíodo día largo 16+8 n= 90.

4.2.8 El AGP21 se encuentra localizado en la membrana plasmática, posiblemente anclado por GPI.

Utilizando las líneas sobreexpresantes de AGP21 fusionada a Venus (35-Sp::V-AGP21) se caracterizó la localización en las células de la epidermis radical de *Arabidopsis thaliana*, y por expresión transiente en las células del mesófilo de *Nicotiana benthamiana*, mediante el análisis en microscopio confocal. Para determinar si Venus-AGP21 es secretada a membrana plasmática y/o luego al espacio apoplástico, se realizó una plasmólisis suave mediante el agregado de una solución de Sorbitol (80 mM) a las hojas de *Nicotiana* que presentaron señal de fluorescencia, o a las raíces de *Arabidopsis* que expresan 35-Sp::V-AGP21. Previamente, fue demostrado que las predicciones del ancla de GPI para el AGP21 fueron comprobadas experimentalmente en *Arabidopsis thaliana* (Borner, et al., 2003; Schultz CJ, et al., 2004). Luego en la incubación con sorbitol fue observada la retracción de la membrana plasmática coincidente con la retracción de la señal fluorescente de Venus-AGP21 (**Figura 18R**).

Se observó la fluorescencia de Venus-AGP21 en el apoplasto luego de la retracción de la membrana por plasmólisis, lo que indica que existe un equilibrio entre dos poblaciones del AGP21: una anclada posiblemente por GPI a la membrana plasmática y otra libre en el espacio apoplástico (**Figura 18R-A, estrella blanca**). Luego de la plasmólisis se observó que la intensidad de fluorescencia disminuyó en la membrana plasmática de las células de *Nicotiana* que expresan V-AGP21, respecto a la intensidad observada previo a la plasmólisis. Ha sido descrito que los AGPs anclados a la membrana plasmática por GPI, al ser expresados transientemente se comportaron de manera similar a Venus-AGP21 luego de la plasmólisis (Zavaliev et al., 2016).

En las células epidérmicas de raíces de *Arabidopsis* que expresan 35-Sp::V-AGP21 no se observó una variación significativa de la intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática, luego de la plasmólisis. A diferencia de lo encontrado en células de *Nicotiana*, la intensidad de fluorescencia de Venus-AGP21 en el apoplasto luego de la retracción de la membrana plasmática no parece disminuir significativamente en todas las células, aunque se observó una cierta acumulación en uno de los extremos de la célula epidérmica (**Figura 18R-B, estrella blanca**). La liberación del AGP21 del ancla de GPI necesaria para su presencia en el espacio apoplástico sería producida por actividad enzimática de Fosfolipasas de membrana. El hecho de que la proteína AGP21 sobreexpresada se acumule en el apoplasto de las células epidérmicas de la raíz, luego de la plasmólisis, sugiere que AGP21 actuaría en la membrana de las células determinando el destino celular en la epidermis radical de *Arabidopsis*. De todas formas son necesarios estudios bioquímicos detallados sobre el AGP21 purificado para poder determinar la presencia del ancla de GPI, así como la estructura del *O*-glicano unido.

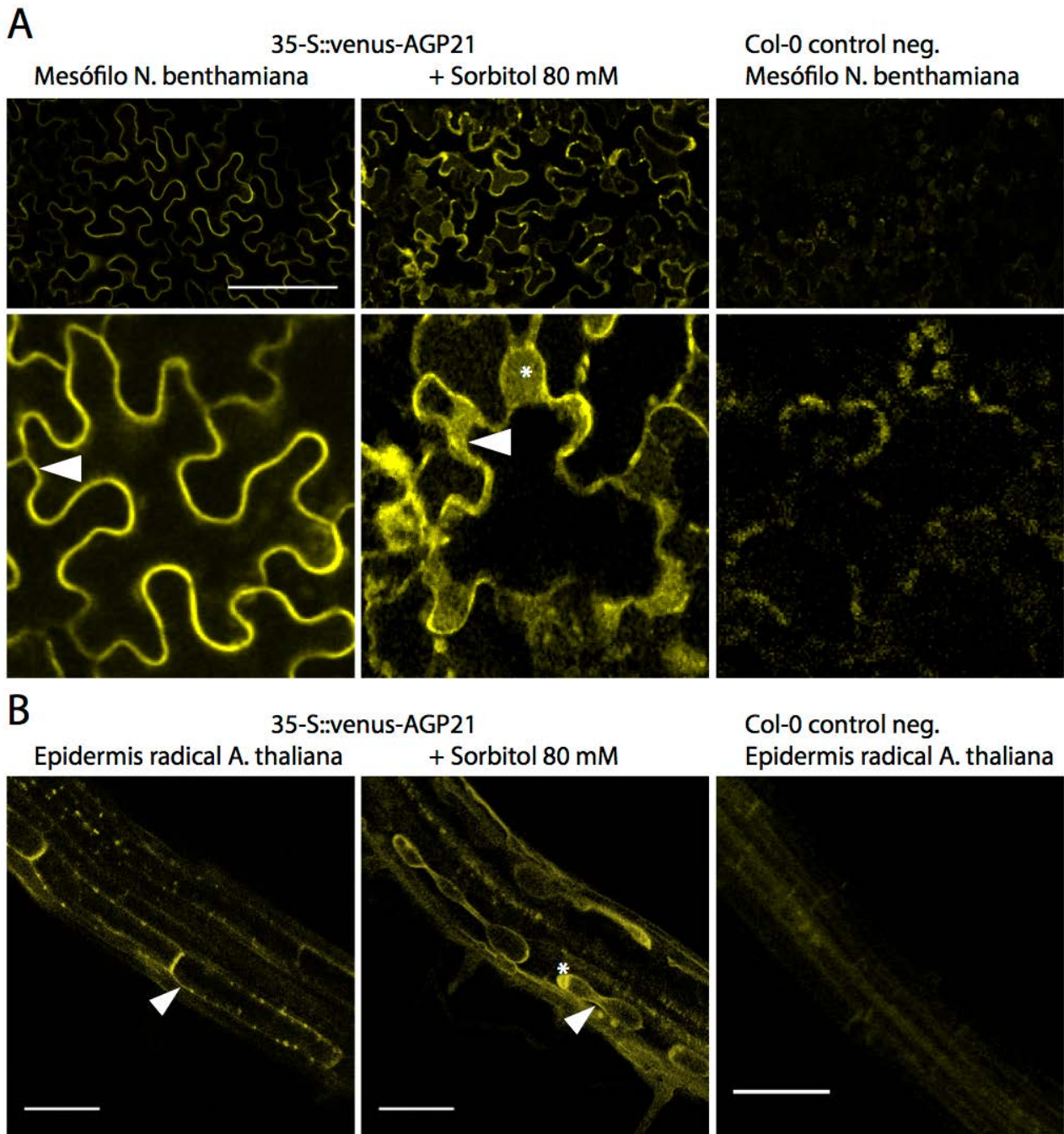


Figura 18R. AGP21 se encuentra unido a la membrana plasmática y en el espacio apoplástico.

A) imágenes de microscopía confocal de hojas de *Nicotiana benthamiana* transfectadas con una construcción sobreexpresante de la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 y plantas no transfectadas como control negativo. **B)** imágenes de microscopía confocal de las células epidérmicas de la raíz de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 y plantas no-transgénicas como control negativo, crecidas durante 7 días en condiciones de control. En ambos casos, se observa que la señal de fluorescencia correspondiente a Venus-AGP21 acompaña la retracción de la membrana plasmática a causa del agregado de sorbitol 80 mM (flechas blancas). Además se observa la presencia de AGP21 en el espacio apoplástico luego de la retracción de la membrana (asteriscos blancos). Escalas 100 μ m.

4.2.9 La localización de AGP21 en tricoblastos es modificada por el tratamiento con β -Glc-Yariv.

Previamente se demostró que el bloqueo de los AGPs por el reactivo β -Glc-Y altera el destino celular en la epidermis de las raíces, produciendo un adelantamiento en la aparición de los pelos respecto al ápice radical y también estimulando la formación de pelos radicales en células epidérmicas adyacentes (**Figuras 1R y 2R**). Al tratar raíces de plantas que expresan AGP21 fusionada a Venus bajo el promotor endógeno de AGP21 (AGP21p::Venus-AGP21) con β -Glc-Y, se observó la pérdida parcial del perfil de localización específico de AGP21 en cada fila de tricoblastos. Resultando la presencia de fluorescencia correspondiente a Venus-AGP21 en células epidérmicas adyacentes, así como el decaimiento anticipado de la intensidad de fluorescencia en las células epidérmicas expandidas en su longitud máxima (**Figura 19R-A**).

En ambos casos, el tratamiento por presencia de β -Glc-Yariv a lo largo del crecimiento de las plántulas observadas produjo un aumento de la relación de intensidad de fluorescencia de V-AGP21 en la membrana plasmática respecto al interior celular (**Figura 19R, flechas rojas**). En presencia del reactivo de control α -Man-Yariv, la proteína de fusión V-AGP21 se localiza en las membranas plasmáticas, pero en el interior de las células puede ser observada con una intensidad relativa menor, tanto en las plantas que expresan AGP21 bajo el promotor endógeno como en las plantas sobreexpresantes de AGP21. Esta observación resulta lógica partiendo del efecto aglutinante de los AGPs que tiene el reactivo de β -Glc-Yariv, el cual desencadenaría la secreción masiva de V-AGP21 como una respuesta compensatoria a la falta de los AGPs bloqueados por el reactivo β -Glc-Yariv. En condiciones normales de crecimiento la sobreexpresión de Venus-AGP21 se observó en todas las células epidérmicas y corticales de la raíz, con una mayor intensidad aparente en la zona meristemática.

El bloqueo de AGPs por el reactivo β -Glc-Y afecta la distribución de V-AGP21 en células de la epidermis de la raíz y además, se produce un incremento en las células que se diferencian para formar pelo radical. En el caso de las plantas sobreexpresantes de AGP21 crecidas en presencia de β -Glc-Yariv, parecen ser menos susceptibles al bloqueo de los AGPs. Manifestado por la menor deformación de las células epidérmicas de la raíz en las plantas sobreexpresantes respecto a las plantas que expresan V-AGP21 con promotor endógeno (**Figura 19R**).

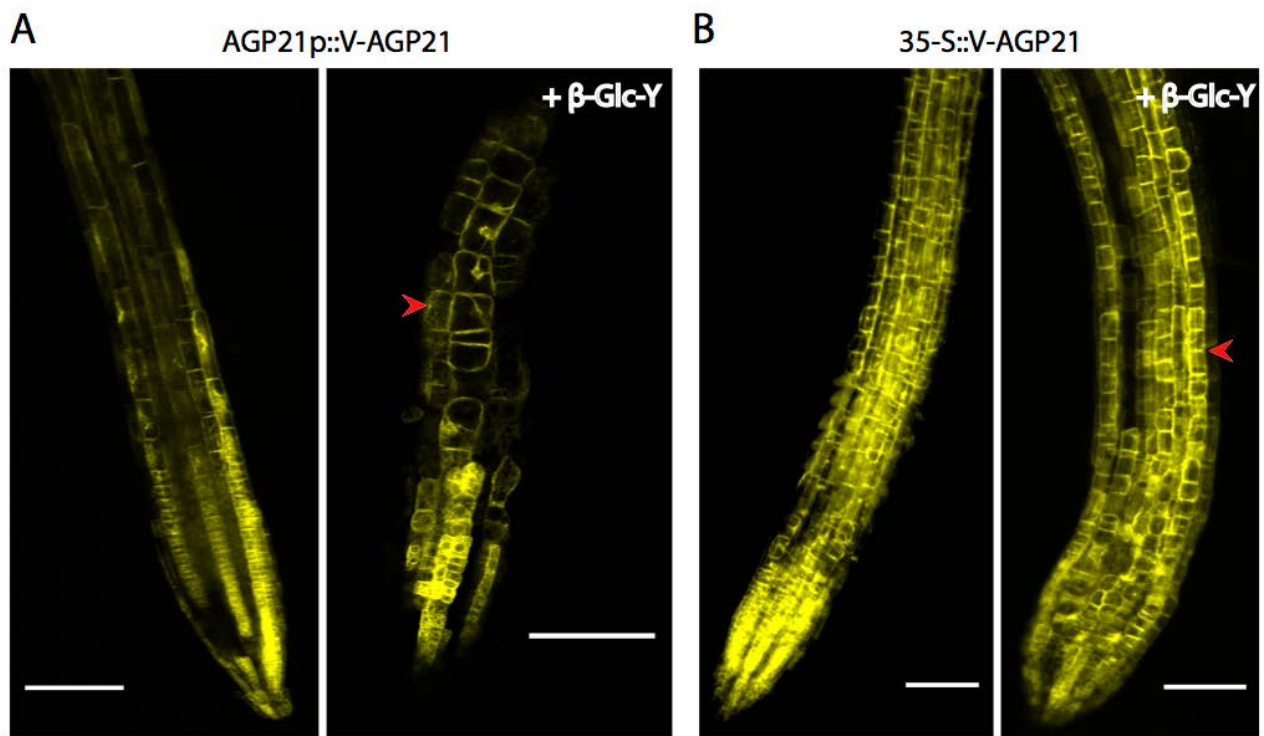


Figura 19R. AGP21 es re-localizado a las células epidérmicas adyacentes por β -Glc-Yariv.

A) Z-stacks de imágenes provenientes de microscopía confocal de raíz de plantas que expresan la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 bajo el promotor endógeno de 1,5 Kbp, crecidas en condiciones de control o en presencia de β -Glc-Y (5 μ M). A causa de β -Glc-Y se observa una re-localización de AGP21 en las células epidérmicas adyacentes (flecha roja). **B)** imágenes de microscopía confocal de la raíz de plantas que expresan la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 bajo el promotor constitutivo 35-S, crecidas en condiciones de control o en presencia de β -Glc-Y (5 μ M). A causa de β -Glc-Y se observa una menor intensidad de fluorescencia en el interior de las células (flecha roja). Todas las plantas fueron crecidas durante 7 días, Escalas 100 μ m.

4.2.10 Capacidad de difusión de Venus-AGP21 por ensayo de la recuperación de la fluorescencia (FRAP).

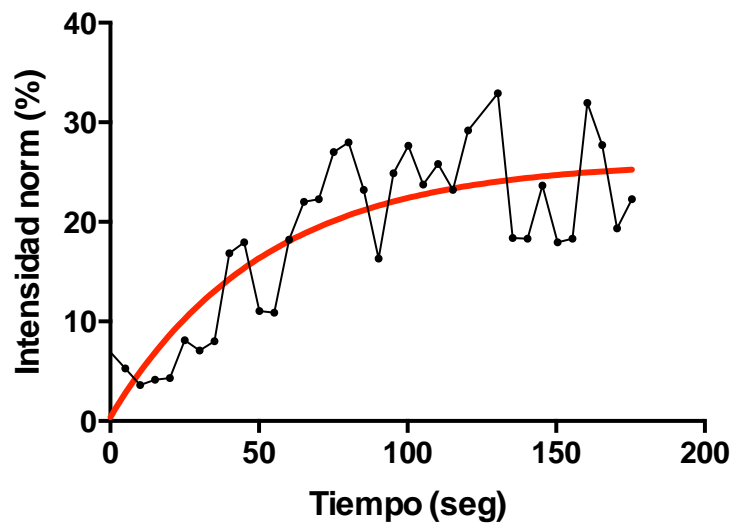
La presencia de un ancla de tipo GPI en el AGP21 fue demostrado previamente, así como el del resto de los once AG péptidos de *Arabidopsis* (Borner GHH, et al., 2003). Previamente la capacidad para la difusión lateral sobre la membrana plasmática de las proteínas ancladas a GPI ha sido analizada por ensayos de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) en células de hoja *Nicotiana tabacum*, resultando un porcentaje de recuperación de la fluorescencia para GFP-GPI en el orden de 26,6% al cabo de 60 segundos. La difusión lateral disminuyó con la presencia de un arabinogalactano, evidenciado con el AGP4 clásico que consta de 135 aminoácidos y un ancla de GPI (GFP-AGP4-GPI), el cual presentó un porcentaje de recuperación de 20,0% al cabo de 60 segundos (Martinière A, et al., 2012).

En esta Tesis se diseñó un experimento de FRAP para estimar el grado de movilidad de la proteína de fusión Venus-AGP21 en las células epidérmicas completamente expandidas, en plantas sobreexpresantes del AGP21 (35-Sp::V-AGP21). El experimento de FRAP fue registrado en una región de interés (ROI) circular centrada en la membrana plasmática, en que inicialmente se comprobó una señal de intensidad de fluorescencia constante correspondiente a la proteína de fusión Venus-AGP21. El fotoblanqueo se realizó con una mayor intensidad del láser de excitación únicamente en la ROI definida. Se adquirió una imagen posterior al fotoblanqueo con la intensidad del láser de excitación similar a las observaciones previas y, al comprobar que la intensidad disminuyó significativamente se comenzó con la adquisición de los datos del promedio de la intensidad de fluorescencia en toda la superficie de la ROI cada 5 segundos.

Los datos de intensidad fueron normalizados y expresados como el % de la intensidad de la fluorescencia recuperada (véase Materiales y Métodos 3.6.4, ecuación 1), y graficada a lo largo del tiempo de recuperación (**Figura 20 R**) (basado en Trung Luu D., et al., 2012). Los datos de fluorescencia recuperada se ajustaron a una ecuación exponencial de asociación en una fase (véase Materiales y Métodos 3.6.4, ecuación 2) (basado en Martinière A, et al., 2012) y se calculó el % de recuperación de la intensidad de fluorescencia al cabo de 60 segundos. El láser de fotoblanqueo incide en la membrana plasmática y también en el citoplasma subyacente, que de existir señal fluorescente la recupera en pocos segundos, dada la mayor velocidad de la circulación citoplasmática relativa a la difusión lateral. El cambio en la media de la intensidad de fluorescencia en la ROI depende de la difusión lateral de Venus-AGP21.

En el caso de la proteína de fusión Venus-AGP21 se obtuvo un porcentaje de recuperación de 17,9% al cabo de 60 segundos, el cual es cercano a los descriptos para GFP-GPI (26,6 %) y para el AGP4-GPI (20%). Esa constante pone de manifiesto que V-AGP21 unido a la membrana plasmática posiblemente por un ancla de GPI se encuentra restringido en lo que respecta a la difusión lateral.

$$R^2 = 0,6868$$



$$(1) \%I = [(I_t - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min})] 100\%$$

$$(2) Y = Y_0 + (Y_{\max} - Y_0) (1 - e^{-kx})$$

Parámetros obtenidos de la ecuación exponencial ajustada a la recuperación de la fluorescencia:

$$Y_0 = 0,39567715 \quad SEM = 3,0932019$$

$$Y_{\max} = 26,12559 \quad SEM = 2,4959283$$

$$K = 0,019326815 \quad SEM = 0,0065052677$$

Figura 20R. Ensayo de recuperación de la fluorescencia (FRAP) de Venus-AGP21.

Plantas 35-Sp.: Venus-AGP21 crecidas durante 7 días. En la recuperación el *time lapse* de la adquisición fue 5 seg. Los datos se graficaron luego de normalizar en porcentaje según la ecuación (1) y luego se ajustaron a una función exponencial de asociación de una fase según la ecuación (2). Se indica el valor R cuadrado de bondad del ajuste de los datos. El procesamiento de los datos se basó en Trung Luu D., et al., 2012 y Martinière A, et al., 2012.

4.2.11 El *O*-arabinogalactano en el AGP21 promueve su estabilización conformacional.

Para abordar el efecto de los *O*-glicanos sobre la conformación y la estabilidad del péptido AGP21 (**Figura 21R-A**) fue considerada una estructura consenso para el arabinogalactano (AG) unida a los residuos de Hyp, el cual consiste en una cadena principal de 5 residuos de (1→3) β-galactano ramificado por (1→6) β-galactano y decorado con (1→3) α-arabinanos, ácido (1→6) β-glucurónico y (1→4) α-fucosil (**Figura 21R-B**). Esta fue la estructura AG consenso que fue caracterizada inicialmente en un péptido sintético de AGP (Tan L, et al., 2004), aunque se han descrito estructuras de los AGs más complejas con hasta 150 residuos de azúcares en los AGPs (Seifert et al., 2007; Kitazawa et al., 2013). Tomando la estructura consenso se realizaron estudios de Dinámica Molecular en colaboración con el Dr. Hugo Verli de la Universidad de Porto Alegre, Brasil.

Con el fin de explorar las conformaciones posibles del péptido hidroxilado correspondiente al AGP21 (ATVEAOAOSOTS), se midió el ángulo formado por cuatro átomos de carbono alfa consecutivos (ζ ángulo). La hélice de poliprolina tipo II presenta un valor de -110 ± 15 grados para el ángulo ζ , obtenido por el promedio de cincuenta modelos (NMR disponibles en PDB ID: 2DJY y 2JMC). Mientras que los péptidos no glicosilados evaluados parecen retener una estructura del tipo hélice de poliprolina II a lo largo de todo el péptido, el péptido maduro de AGP21 ATVEAOAOSOTS completamente arabinogalactosilado adopta una estructura un poco más prolongada entre Pro2-Thr7, como se observó por los ζ ángulos 2-3 más cercanos a los 180 grados que en las otras condiciones (**Tabla 5A**). Este análisis sugiere que el arabinogalactano consenso unido al AGP21 afecta la conformación y estabilidad del péptido AGP21 maduro.

Para evaluar la conformación y la dinámica del péptido maduro de AGP21 sin glicosilar (ATVEAOAOSOTS) y *O*-glicosilado en sus tres residuos de Hyp con la estructura del AG consenso (O-AG-1,2,3), se realizaron simulaciones por dinámica molecular de dos péptidos no glicosilados y un arabinogalactano (**Figura 21R-C a F**). A partir de estas simulaciones se obtuvo una desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) hasta ~ 6 Amstrong, lo que indica que en algunas de las simulaciones la estructura del péptido se pudo haber desviado de la hélice de partida del tipo poliprolina II.

Los mayores efectos para la estabilización conformacional se observan con la *O*-glicosilación, ya que disminuye la fluctuación de la raíz media de la distancia (RMSF) en el péptido AGP21 completamente glicosilado, si bien al menos una parte del péptido maduro estaría expuesto al disolvente. Además se pudo determinar que en el estado de glicosilación las cadenas del arabinogalactano se ubican siempre en la misma orientación con relación al péptido (**Figura 21R**).

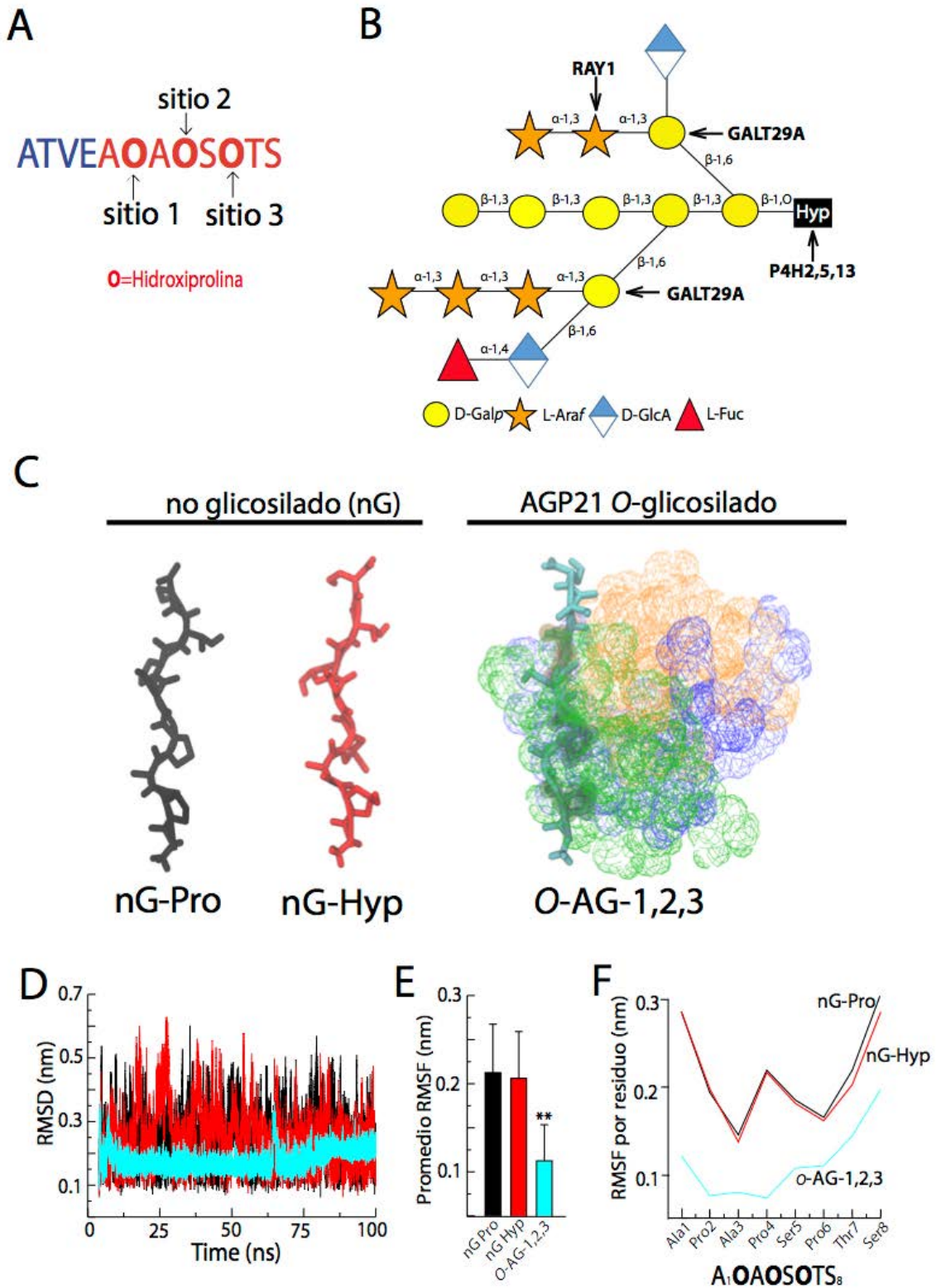


Figura 21R. Los *O*-arabinogalactanos en AGP21 confieren mayor estabilidad conformacional.

A) secuencia de aminoácidos del péptido AGP21, se indican los residuos de hidroxiprolina los cuales son sustratos para la *O*-glicosilación. **B)** estructura del arabinogalactano modelado con los glicanos y el tipo de enlace glicosídico, se señalan las enzimas glicosil-transferasas y prolil-hidroxilasas necesarias para la biosíntesis del AGP. **C)** configuraciones en el espacio del AGP21 péptido inmaduro (negro), con los residuos de prolina hidroxilados (rojo) y con los tres residuos de hidroxiprolina *O*-glicosilados (turquesa), según el modelado por dinámica molecular. **D,** desviación de la raíz cuadrada media para todos los átomos (RMSD) a lo largo del tiempo del modelado; fluctuación de la raíz media cuadrada (RMSF) obtenida promediando los valores por residuo en la simulación de cada péptido. nG, no glicosilado; glyC) glicosilado.

4.3 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN POR BRASINOESTEROIDES (BRs)

4.3.1 La vía de BR es crucial para el destino celular y la expansión en la epidermis de la raíz en *Arabidopsis*.

Las plantas mutantes del receptor de BR *bri1-5* y *bri1-116* desarrollaron grandes cantidades de pelos adyacentes, así como un adelantamiento en la aparición del primer pelo radical (**Figura 22R**) en forma similar a lo descrito previamente (Cheng, et al., 2014). Las raíces de *bri1-116* presentaron un fenotipo de alteración en el destino celular de la epidermis muy parecido a las plantas Col-0 tratadas con β -Glc-Y (**Figura 1R**). En el mismo sentido, el número de las células presentes en las zonas meristemáticas y de elongación de las raíz en las plantas *bri1-116* es menor que las presentes en WT. La expansión disminuida de las células epidérmicas, junto con el reducido número de células, se manifiesta en la aparición temprana de los primeros pelos radicales en las plantas *bri1-116* (**Figura 22R y Figura 23R**).

Los factores de transcripción constitutivamente activos en las plantas mutantes *bes1-D* y *bzr1-D* no generaron fenotipos de diferenciación de las células epidérmicas diferentes al WT. El número de las células de la zona meristemática de la raíz tanto *bes1-D* como *bzr1-D* fue menor que en el WT, aunque la expansión celular pareciera ser mayor en *bes1-D* y en *bzr1-D* respecto al WT. Es posible que el número reducido de células en *bes1-D* y *bzr1-D* sea compensado con la longitud máxima alcanzada en las células epidérmicas, dando por resultados similares a WT para la distancia de aparición del primer pelo radical.

Las plantas mutantes *bri1-5* y *bri1-116* que presentan la vía de BR afectada muestran fenotipos similares a los obtenidos por tratamiento con los inhibidores de P4Hs, así como en las plantas mutantes de T-ADN para las enzimas prolil-hidroxilasas (triple mutante *p4h2,p4h5,p4h13*) y glicosil-transferasas (*ray1* y *gt29-1*). Esto sugiere, una posible regulación a nivel hormonal por BR para el destino celular en la epidermis mediada por AGP. Esta posibilidad es sustentada por el hecho de que ha sido determinado que el BR induce la expresión de ciertos AGPs a través de la unión del factor de transcripción BZR1 (Nemhauser et al.2006, Vert et al., 2005) (**Tabla 2A**).

Varios de los genes que codifican para AGPs cuyos transcritos son abundantes en la ZE de la raíz (**Figura 10R-A**), han sido reportados como genes blanco del factor de transcripción BZR1, y a su vez, inducidos por tratamientos con BL (**Tabla 3A**). Estos resultados junto a los fenotipos observados en las mutantes de AGPs, o los causados por el bloqueo bioquímico por β -Glc-Yariv, sugieren un mecanismo de regulación del proceso de expansión celular en la raíz dirigido por la vía de BRs y posiblemente mediado por AGPs.

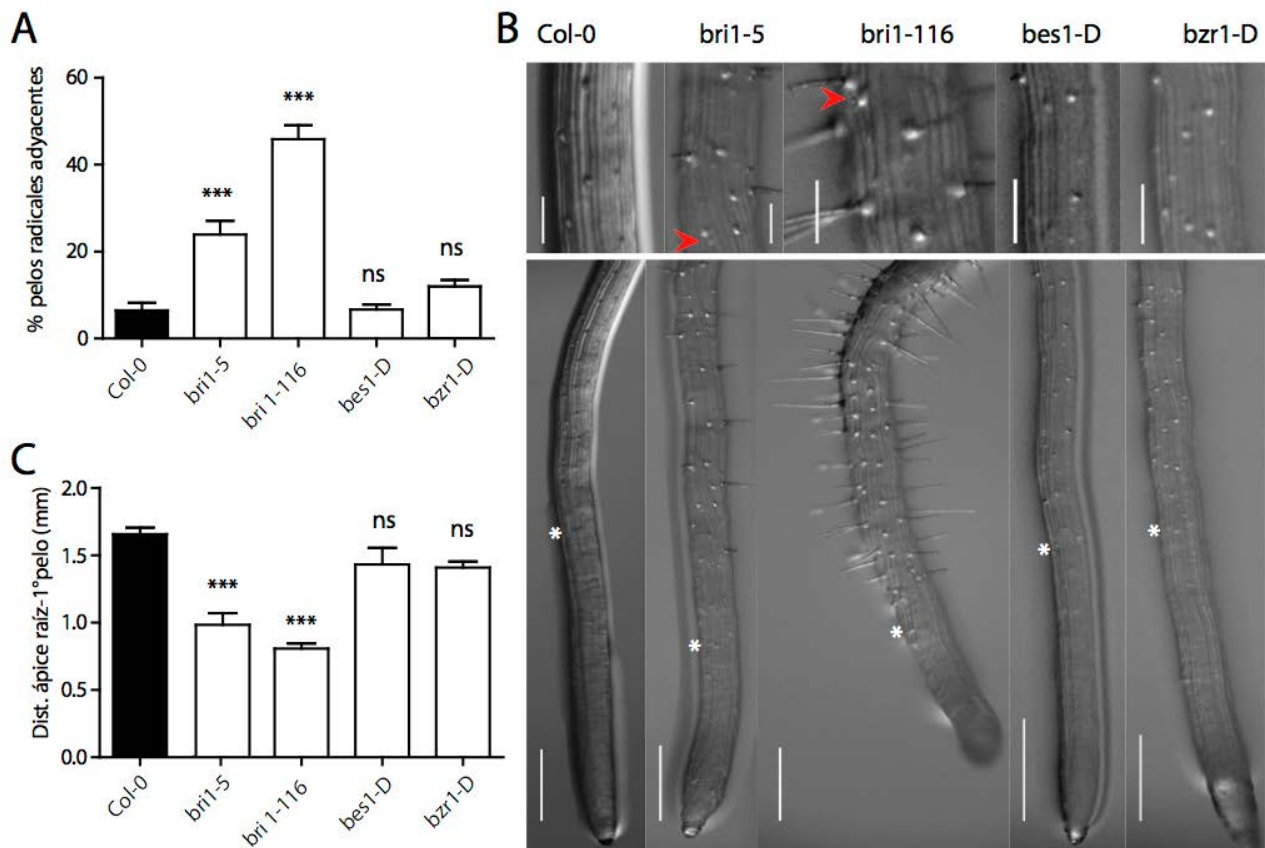


Figura 22R. Plantas mutantes de la vía de señalización de brasinoesteroides presentan diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos anormal en las raíces.

A) el % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas es mayor en plantas mutantes del receptor de brasinoesteroide *bri1-5* y *bri1-116*. Las plántulas mutantes de ganancia de función de los factores de transcripción BZR1 y BES1 (*bzr1-D* y *bes1-D*) presentan un fenotipo similar a Col-0. **B)** imágenes de raíces de plántulas mutantes *bri1-5*; *bri1-116*; *bzr1-D*; *bes1-D* crecidas durante 7 días. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); Escala 100 μ m. Panel inferior, se indica la aparición del primer pelo radical (estrella blanca); Escala 0,5 mm. **C)** la distancia desde el ápice radical hasta la aparición del primer pelo es menor en las raíces de las plántulas mutantes *bri1-5* y *bri1-116* respecto a Col-0. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas.

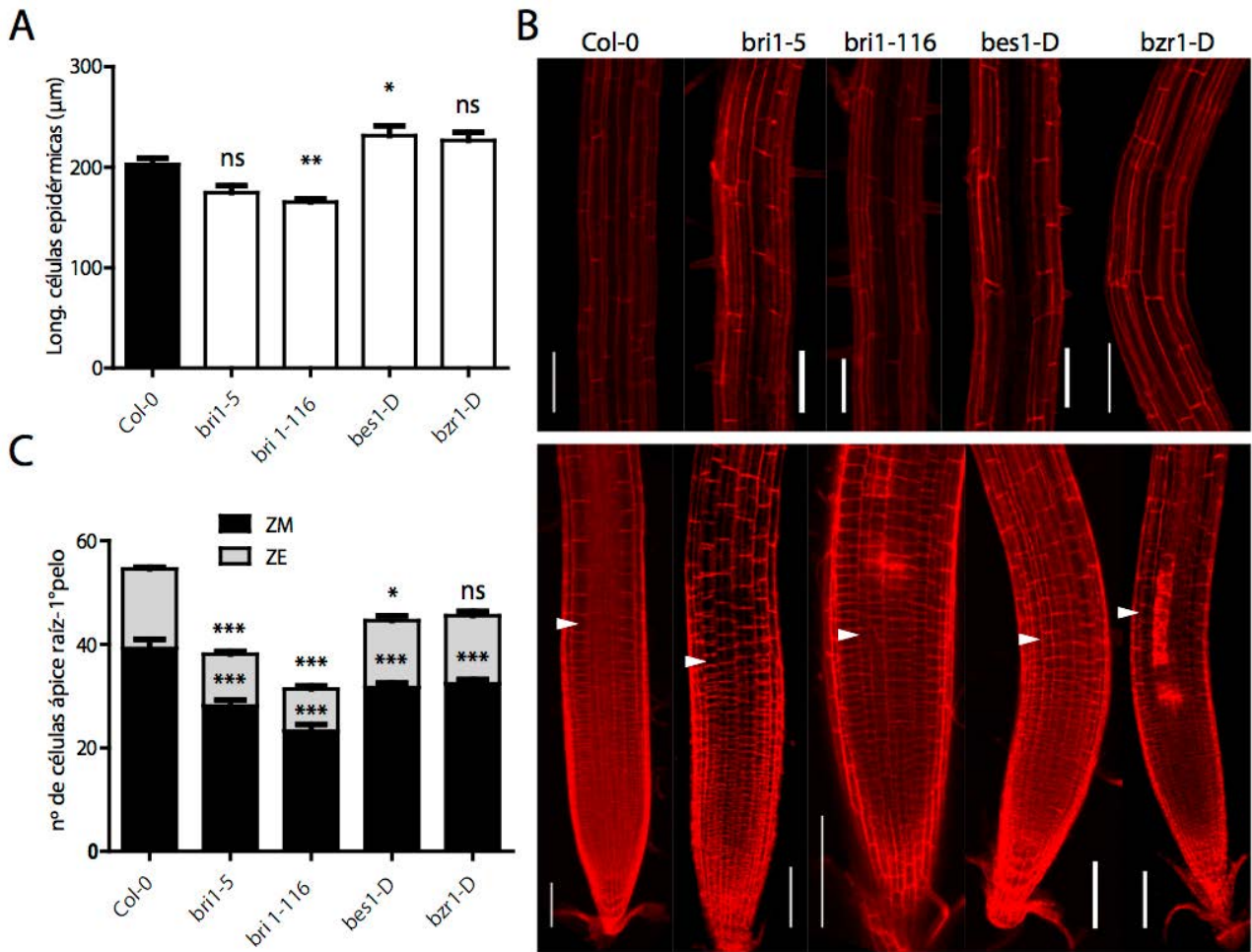


Figura 23R. Plantas mutantes de la vía de señalización de brasinoesteroides presentan expansión y división celular anormales en las raíces.

A) la longitud de las células epidérmicas expandidas es menor en las plántulas mutantes *bri1-5* y *bri1-116* respecto a Col-0. **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces luego de la tinción con ioduro de propidio de plántulas mutantes *bri1-5*; *bri1-116*; *bzr1-D*; *bes1-D* crecidas durante 7 días; Escala 100 μm . Panel superior, células epidérmicas expandidas. Panel inferior, se indica el final del meristema radical (flecha blanca). **C)** el número de células pertenecientes a la zona meristemática (ZM) y a la zona de elongación hasta la aparición del primer pelo (ZE) es menor en las plántulas mutantes *bri1-5* y *bri1-116*. En las gráficas de barras se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns, diferencias no significativas.

4.3.2 La expresión de la proteína AGP21 es regulada por la vía de BR.

Previamente fue determinado por experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina y posterior secuenciación (Chip-seq) que el factor de transcripción BZR1 se une al ADN en el *E-Box* definido por la secuencia: CATGTG (Yu Sun et al., 2010). El *E-Box* está presente en el promotor endógeno del gen AT1G55330, que codifica para el AGP21, a 279 bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Adicionalmente, luego del tratamiento de plántulas con la hormona BL (la forma más activa de los brasinoesteroides) fue cuantificado por RNA-seq, el aumento de los transcriptos de AGP21 (**Tabla 3A**) (Oh, et al., 2012).

La región promotora de 1,5 kbp de AGP21 clonada incluye el *E-Box* de unión al factor de transcripción BZR1 de la vía de señalización de brasinoesteroides (**Tabla 7A**). Para comprobar el aumento de los niveles de la proteína AGP21 por presencia de BL se utilizaron las plantas transgénicas que contienen la proteína de fusión Venus-AGP21 bajo la región promotora clonada (AGP21p::V-AGP21). Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal de la epidermis de las raíces de plantas AGP21p::V-AGP21 crecidas en presencia o no de BL. Se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia correspondiente a V-AGP21 a causa del tratamiento con BL, confirmando que la expresión del gen de AGP21 es activada por brasinoesteroides en las células epidérmicas de la raíz (**Figura 24R**). A partir de las imágenes obtenidas se obtuvo el perfil de expresión de Venus-AGP21 a lo largo de la raíz desde el ápice radical hasta la zona de maduración, para las plantas crecidas en presencia o ausencia de BL. El perfil de expresión de V-AGP21 a lo largo de la raíz no es afectado por tratamiento con BL. Aunque, parece observarse señal de fluorescencia en algunas células epidérmicas adyacentes en la zona meristemática (ZM) y al comienzo de la zona de elongación (ZE) de la raíz, en presencia de BL (**Figura 24R-B**).

Para determinar si el gen que codifica para AGP21 responde a BR mediado por el receptor BRI1, se realizó la cruce de plantas *bri1-116* con plantas que incluyen el promotor de AGP21 río arriba de la proteína verde fluorescente (AGP21p::GFP). Se analizó la descendencia de la cruce y se identificaron las plantas mutantes homocigotas para el receptor BRI1 que expresan GFP bajo el promotor de AGP21 clonado (*bri1-116/AGP21p::GFP*). Las plantas *bri1-116/AGP21p::GFP* presentaron un fenotipo anormal de desarrollo de la raíz similares a la mutante *bri1-116*.

Las plantas AGP21p::GFP presentaron mayores niveles de intensidad de fluorescencia en la epidermis de la raíz, respecto a las plantas *bri1-116/AGP21p::GFP*, confirmando en este caso que la activación de AGP21 por BR es mediada a través del receptor BRI1. A su vez, en plantas AGP21p::GFP crecidas en presencia de BL la intensidad de fluorescencia fue mayor respecto a las plantas crecidas en condiciones de control. Lo que significa, que la expresión del gen de AGP21 controlada por BR (**Figura 25R-C**).

Por otra parte, la proteína fluorescente GFP soluble es observada en citoplasma y en el núcleo de las células epidérmicas, con una clara localización específica en tricoblastos. Es interesante notar que en la raíz de *bri1-116/AGP21p::GFP* la localización de la señal fluorescente es observada en dos células epidérmicas adyacentes que han comenzado a formar el pelo radical. Esa observación es consistente con la expresión y la localización específica descrita de AGP21 en tricoblastos de la raíz, que en ausencia del receptor de BR, sería re-localizada a células epidérmicas adyacentes (**Figura 25R-B, flecha roja**). Tal como sucede en raíces que expresan Venus-AGP21, que a causa del bloqueo de los AGPs por el tratamiento con β -Glc-Y, AGP21 es re-localizada a células epidérmicas adyacentes (**Figura 19R-A, flecha roja**).

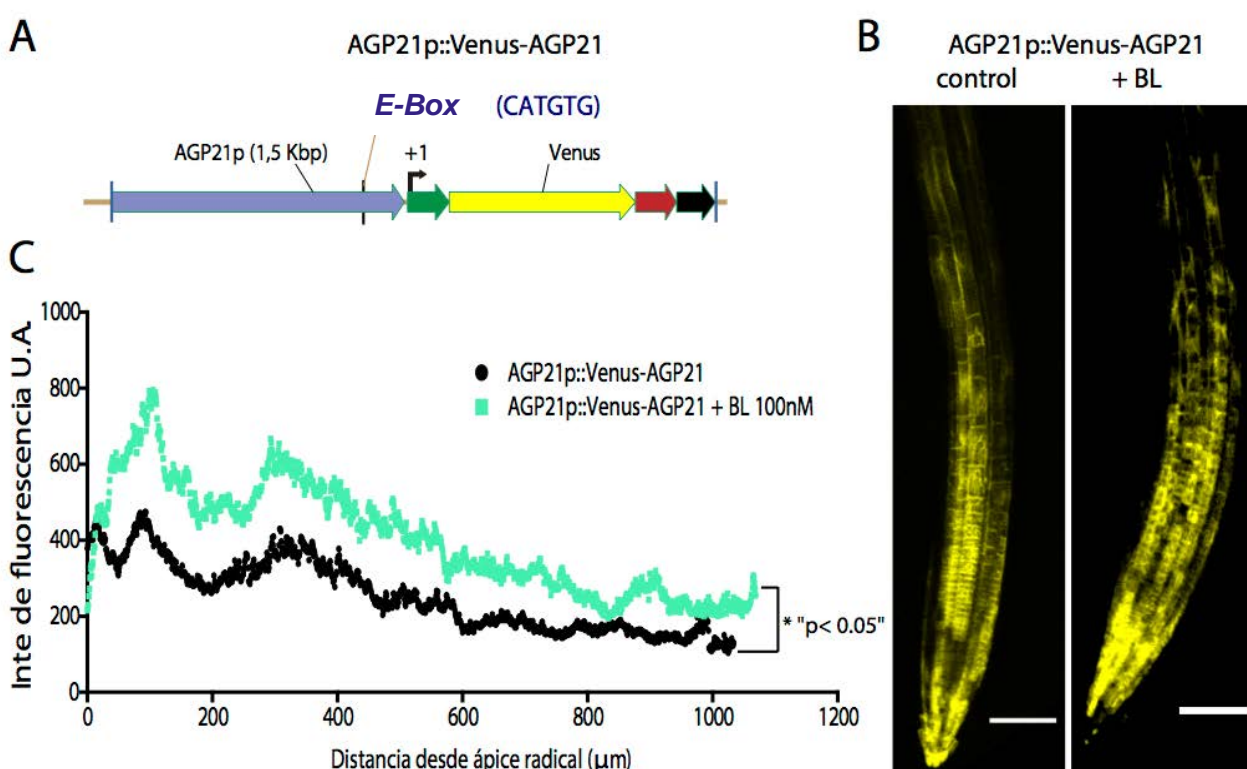


Figura 24R. AGP21 responde a la presencia de la hormona brasinoesteroide.

A) esquema de la construcción clonada para la expresión de la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 bajo el control de la región promotora del gen AGP21 que incluye el motivo de respuesta a brasinoesteroide *E-Box*. **B)** imágenes de microscopía confocal de raíz de plantas que expresan la proteína de fusión fluorescente Venus-AGP21 bajo el promotor endógeno de 1,5 Kbp, en condiciones de control o luego del tratamiento con brasinólido (BL). A causa de BL se observa un aumento en la intensidad de la señal fluorescente correspondiente a Venus-AGP21. Plantas crecidas durante 7 días, Escala 100 μ m. **C)** cuantificación de la intensidad de la fluorescencia a lo largo de un eje segmentado trazado desde el ápice radical y siguiendo una misma fila de células. Las intensidades de fluorescencia fueron obtenidas a partir de una recta segmentada trazada a lo largo de las células mediante el comando *plot profile* del programa ImageJ (Véase materiales y métodos, <http://www.imagej.nih.gov/ij/>). Test de student respecto al control, en cada caso n=30.

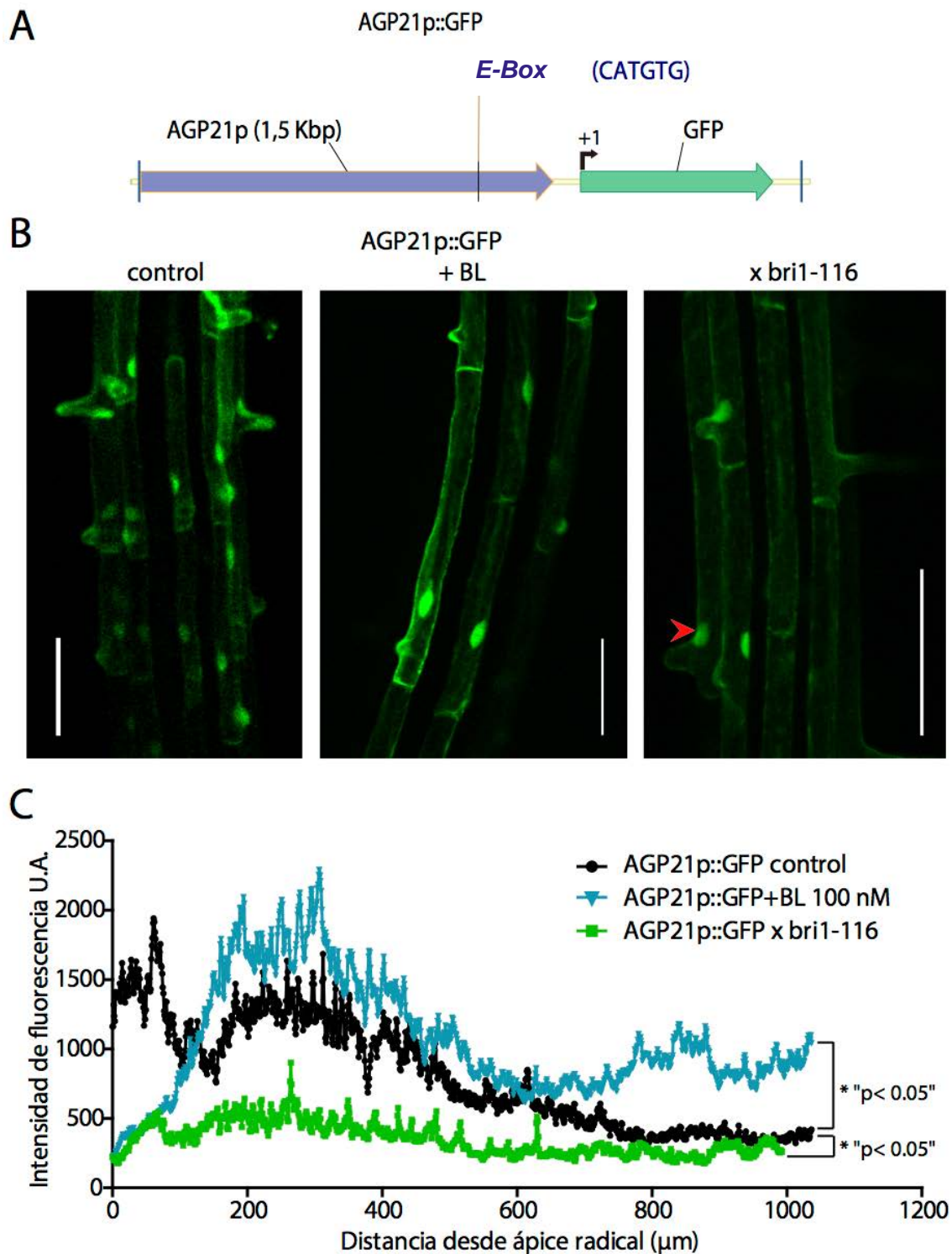


Figura 25R. La vía de señalización de brasinoesteroide modula la expresión del gen AGP21.

A, esquema de la construcción reportera de la región promotora de 1,5 Kbp del gen AGP21 que incluye el motivo de respuesta a brasinoesteroide *E-Box*. **B**) imágenes de microscopía confocal de pelos radicales de plantas que expresan la proteína verde fluorescente bajo el promotor clonado de AGP21, en condiciones de control, luego del tratamiento con brasinólido (BL), o en plantas mutantes para el receptor de brasinoesteroides *bri1-116*. Plantas crecidas durante 7 días, Escala 100 μm . **C**) cuantificación de la intensidad de la fluorescencia a lo largo de un eje segmentado trazado desde el ápice radical y siguiendo una misma fila de células. Las intensidades de fluorescencia fueron obtenidas con el *com&o plot profile* del programa ImageJ (<http://www.imagej.nih.gov/ij/>). Test de student respecto al control, en cada caso n=30.

4.4 LOS FACTORES QUE PROMUEVEN EL DESTINO CELULAR TRICOBLASTO SON ACTIVADOS POR EL BLOQUEO DE AGPs

4.4.1 Los niveles de expresión del factor BZR1 son reducidos por el bloqueo de AGPs.

Los genes que codifican para AGPs clásicos: AGP2, AGP4 y AGP7; y los genes que codifican para los AG péptidos: AGP12, AGP13, AGP14, AGP21, AGP22, AGP24; tienen un patrón de expresión específico en la zona de elongación de la raíz (**Figura 10R-A**). Es interesante resaltar que los mismos genes mencionados hayan sido reportados como los AGPs más regulados positivamente en plantas con el factor BZR1 constitutivamente activo (plantas *bzr1-D, bri1-116* respecto a plantas *bri1-116*) (Yu Sun, et al., 2010) (**Tabla 3A**).

Dada la importancia del bloqueo de los AGPs para el establecimiento del destino celular y para el proceso de expansión celular en la epidermis, donde son específicamente expresados ciertos AGPs regulados por BR a través del factor de transcripción BZR1. Se determinó si el bloqueo de los AGPs por tratamiento con β -Glc-Y es compensado con la activación de BZR1 por el agregado de BL. Para ello se utilizaron plantas que expresan la proteína de fusión BZR1-YFP bajo el control del promotor endógeno de BZR1 (BZR1::BZR1-YFP) (Chaiwanon, J, & Wang, ZY, 2015), crecidas en condiciones de control, en presencia de β -Glc-Y o BL, o ambos (**Figura 26R**).

Así como fue descrito anteriormente (**Figura 1R**), el tratamiento control por α -Man-Y no produjo efecto alguno ya que las plantas BZR1::BZR1-YFP son similares al WT. El tratamiento con β -Glc-Y desencadena el adelantamiento del destino celular de tricoblastos y la formación de pelo radical en células epidérmicas adyacentes. Sin embargo, las raíces con β -Glc-Y y BL presentaron un fenotipo de retorcimiento general muy diferente a las raíces en condiciones de control, mientras que el adelantamiento del destino celular de tricoblasto no es evidente, como en las raíces tratadas con β -Glc-Y (**Figura 26R-A**). Esto sugiere que no hubo un efecto compensatorio por activación de la vía de BR al bloqueo de AGPs, al menos en las dosis de BL y β -Glc-Y utilizadas. La presencia de BL solo no generó un fenotipo diferente al control.

De cada tratamiento al que fueron expuestas las plantas BZR1::BZR1-YFP se observaron las raíces al microscopio confocal y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de BZR1-YFP a lo largo de cada fila de células epidérmicas, desde el ápice radical hasta la ZE. Observándose que con el agregado de BL la intensidad correspondiente a BZR1-YFP aumenta respecto al control, manteniendo el perfil de expresión con un máximo bien definido ubicado en el inicio de la ZM, y el decaimiento progresivo de la intensidad hacia la ZE de la raíz. En cambio, el tratamiento con β -Glc-Y solo o en presencia de BL, produjo una disminución de la intensidad de fluorescencia respectiva y a la vez, la pérdida del perfil de expresión de BZR1-YFP (**Figura 26R-B**).

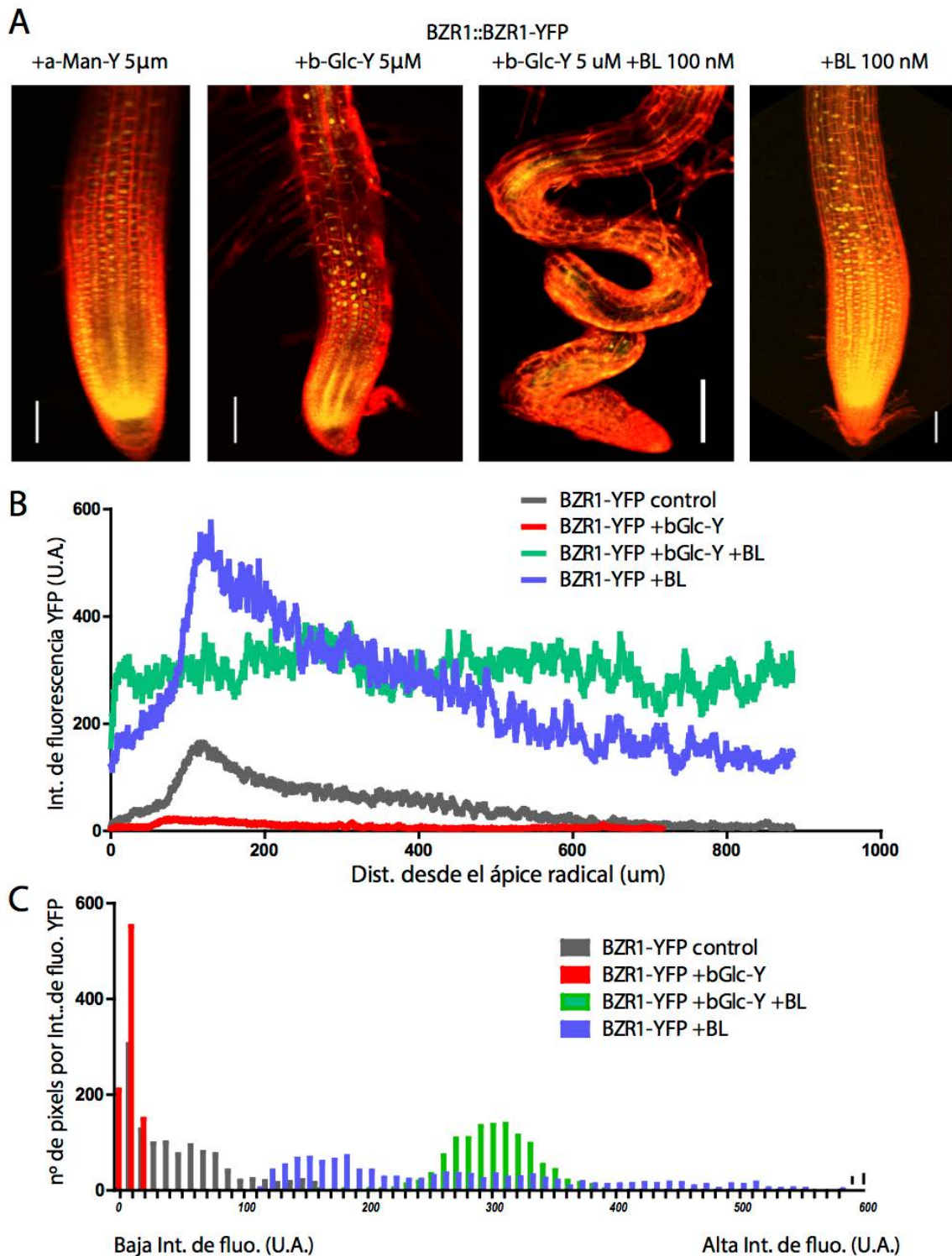


Figura 26R. El bloqueo de los AGPs produce la inhibición de la expresión del factor BZR1.

A) imágenes de microscopía confocal de raíces de plantas que expresan la proteína amarilla fluorescente fusionada al factor de transcripción BZR1 bajo el promotor endógeno de BZR1 (BZR1::BZR1-YFP), en condiciones de control (+ α -Man-Y), luego del tratamiento con β -Glc-Yariv (+ β -Glc-Y), brasinólido (+BL), o ambos (+ β -Glc-Y +BL). Plantas crecidas durante 7 días, Escala 100 μ m. B) cuantificación de la intensidad de la fluorescencia a lo largo de un eje segmentado trazado desde el ápice radical y siguiendo una misma fila de células. Las intensidades de fluorescencia fueron obtenidas con el comando *plot profile* del programa ImageJ (<http://www.imagej.nih.gov/ij/>). C) histograma de frecuencias para el número de *pixels* en cada rango de intensidad de fluorescencia, para cada tratamiento. Test de student respecto al control, en cada caso n=30.

4.4.2 El bloqueo de AGPs afectaría la señalización de BR activando BIN2.

La reducción de los niveles del factor de transcripción BZR1 en las células de la epidermis radical a causa del bloqueo de los AGPs por β -Glc-Y, sugiere una posible interrupción en la vía de señalización de BR. Puesto que los AGPs más expresados en la ZE estarían unidos por anclas de GPI a la membrana, entre ellos el AGP21, es posible que la alteración de AGPs en la superficie celular afecte la percepción de BRs y por ello, a la vía de señalización de brasinoesteroide en su conjunto. Para evaluar el impacto en la vía de BR por el tratamiento de β -Glc-Y, se prosiguió el análisis hacia el componente en la vía de BR que puede reducir los niveles de BZR1: la enzima kinasa GSK3, también denominada *Brassinosteroid Insensitive2* (BIN2), que tiene por sustrato a BZR1.

BIN2 es adecuado para evaluar el impacto que desencadena el bloqueo de AGPs en la vía de BR, ya que fue identificado un mutante para BIN2 de ganancia de función: *bin2-1*, el cual presenta un fenotipo de formación de pelo radical en células epidérmicas adyacentes, similar al obtenido por bloqueo de AGPs. Mientras que el fenotipo de la triple mutante *knock out* de BIN2 y de sus dos homólogos más cercanos SK2-2 y SK2-3: *bin2-3/bil1/bil2* (*gskII*), presenta un fenotipo de menor formación de pelo radical en la epidermis (Cheng et al.2014).

Para evaluar la sensibilidad de BIN2 al bloqueo de AGPs por β -Glc-Y, fueron crecidas en diferentes concentraciones de β -Glc-Y, las plántulas: *bin2-1* de ganancia de función, la triple mutante *gskII* y Col-0 como control del ensayo. En el caso de *bin2-1* la formación del pelo radical en células epidérmicas adyacentes fue aumentado levemente con las concentraciones crecientes de β -Glc-Y, y una respuesta similar fue observada en las raíces de las plantas triple mutante *gskII*. Tanto *bin2-1* como *gskII* se comportaron como insensibles en comparación a la respuesta observada en el control Col-0, para el bloqueo de los AGPs por β -Glc-Y. En las plantas Col-0 se encuentra BIN2 que podría ser el responsable de la promoción del destino celular tricoblasto en células adyacentes de la epidermis desencadenado por el tratamiento con β -Glc-Y (**Figura 27R-A**).

El bloqueo de los AGPs por β -Glc-Y desencadena el adelantamiento del destino celular de tricoblastos manifestado por la disminución de la distancia de aparición del primer pelo radical. Si bien las plántulas *bin2-1* y *gskII* presentan un fenotipo de adelantamiento del primer pelo radical, respecto al control WT, ambas mutantes resultan sensibles al bloqueo progresivo de AGPs por el reactivo β -Glc-Y. Lo que sugiere que habría otro componente de la vía de señalización de BR en que actuaría β -Glc-Y para generar el adelantamiento del destino celular de tricoblastos en raíces (**Figura 27R-B**). Es de destacar, que las plántulas *bin2-1* y *gskII* también se comportan de manera sensible en lo que concierne a la inducción de la expansión celular de los pelos radicales en respuesta a las concentraciones crecientes de β -Glc-Y (**Figura 27R-C**).

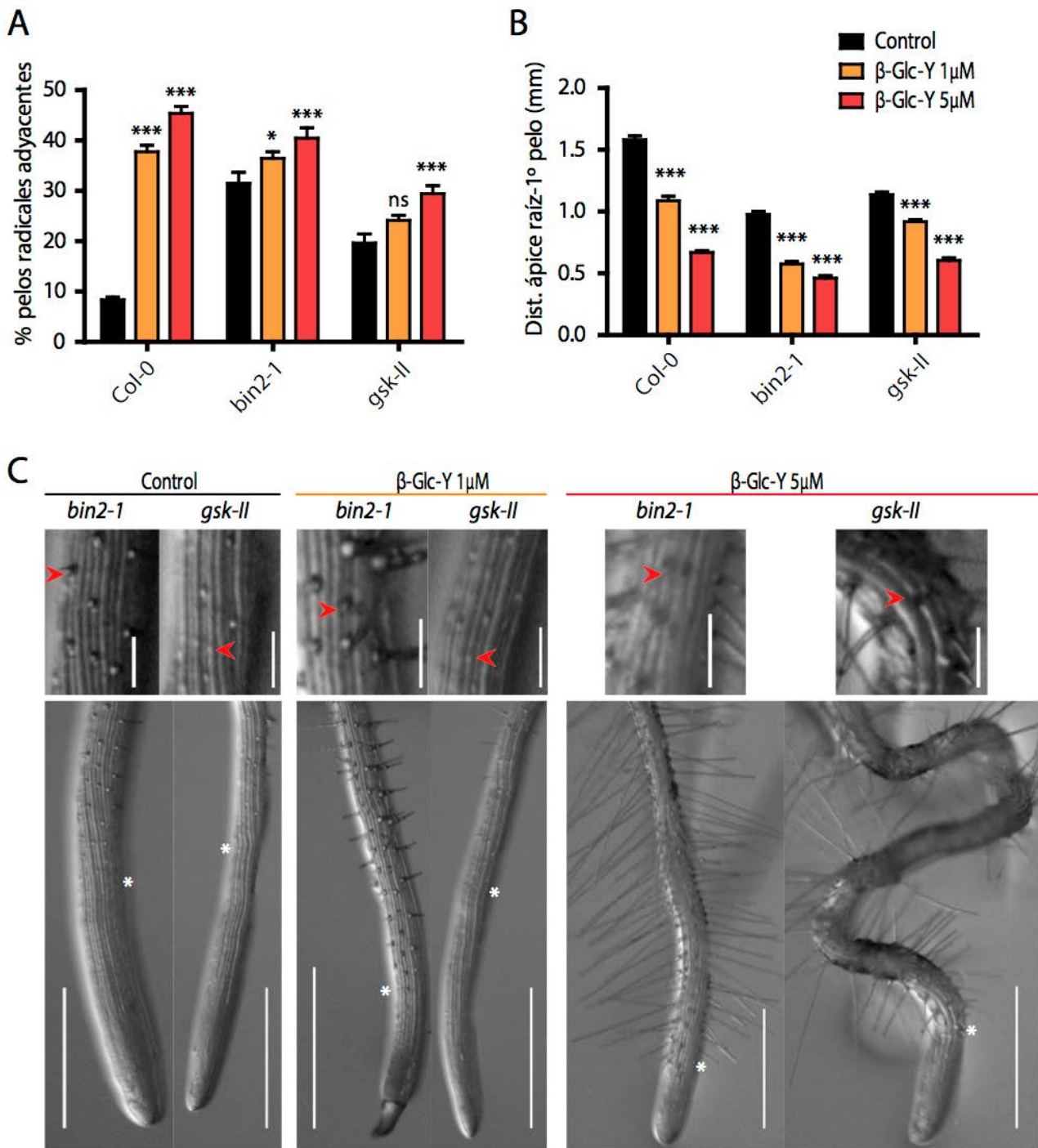


Figura 27R. Plantas mutantes de la kinasa BIN2 presentan diferenciación anormal de las células epidérmicas en las raíces y son insensibles al bloqueo de los AGPs.

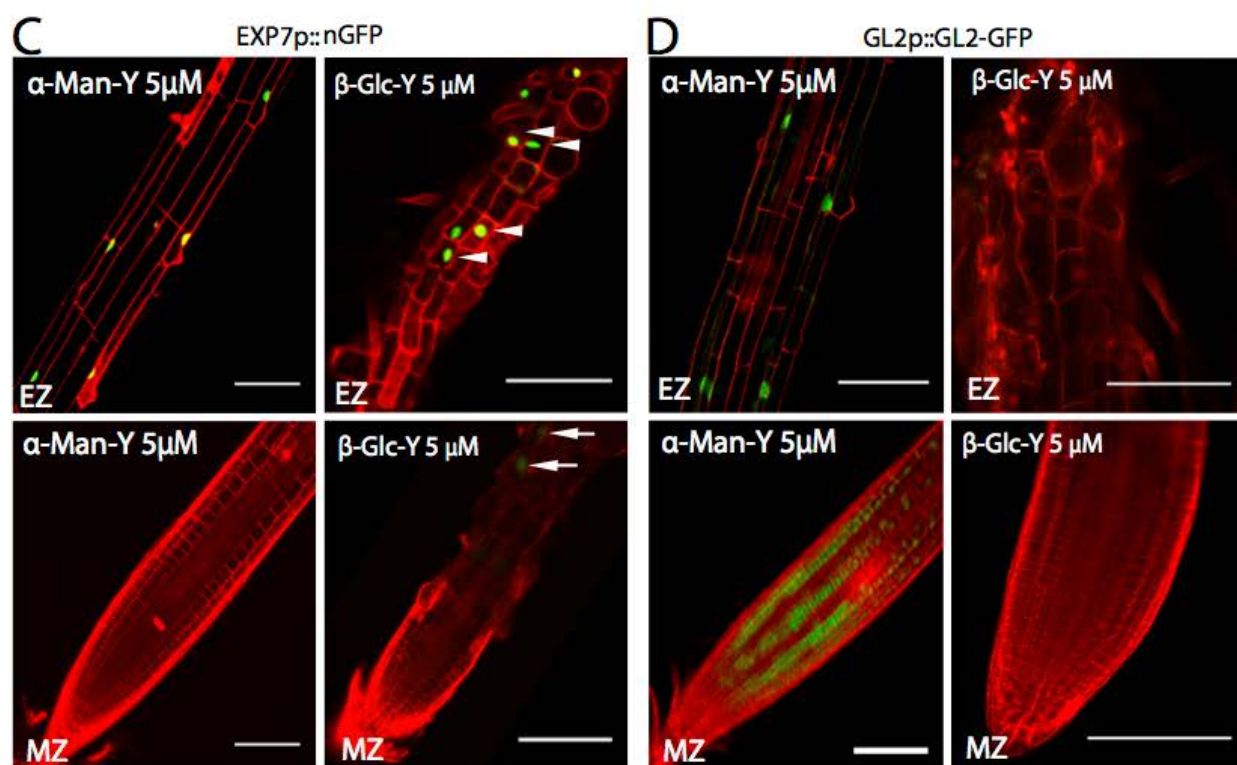
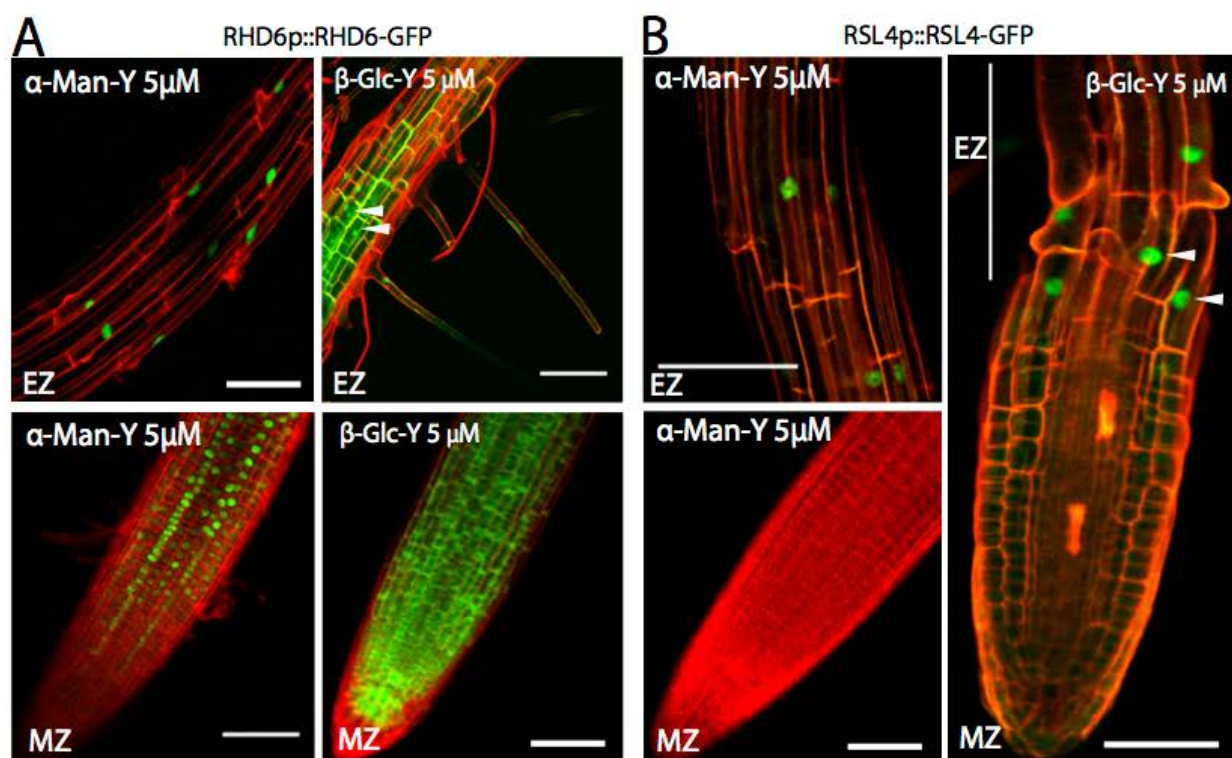
A) el % de los pelos radicales adyacentes en células epidérmicas es mayor en plantas triple mutantes para las tres principales Kinasas Glicosil-sintasas de la vía de brasinoesteroide (*gsk-II*). Las plantas mutantes de ganancia de función de la kinasa BIN2 (*bin2-1*) presentan un fenotipo de mayor diferenciación tricoblástica respecto a Col-0 y también, son insensibles al bloqueo de AGPs por el reactivo de Glucosil-Yariv. **B)** la distancia desde el ápice radical al esbozo del primer pelo es menor en las raíces de las plántulas mutantes *gsk-II* y *bin2-1* respecto a Col-0. En las gráficas de barra se representa la media, el error medio y el test de Anova respecto al control, en cada caso n=30. Los asteriscos indican * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; ns, diferencias no significativas. **C)** imágenes de raíces de plántulas mutantes *gsk-II* y *bin2-1* crecidas durante 7 días. Panel superior, detalle de pelos radicales en células adyacentes (flecha roja); barra 100 μ m. Panel inferior, se indica el esbozo del primer pelo radical (estrella blanca); barra 0,5 mm.

4.4.3 Los factores de transcripción GL2, RHD6, RSL4 que regulan el destino celular en la epidermis de la raíz, son expresados anormalmente por el bloqueo de los AGPs.

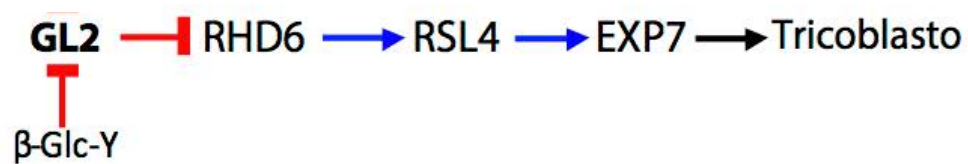
La actividad de la kinasa BIN2 responsable de la fosforilación de WER y TTG1, determinantes para el establecimiento del destino celular tricoblasto, ha sido descrita previamente (Cheng *et al.*, 2014). Puesto que BIN2 incluye como sustratos de fosforilación a los elementos del complejo WER-TTG1-EGL3 responsables del destino atricoblasto en la epidermis, BIN2 produce el desensamblado del complejo, suprimiendo la activación del modulador *Glabra2* (GL2) y promoviendo la des-represión del factor responsable del destino tricoblasto *Root Hair Defective6* (RHD6). Una vez que se expresa RHD6 se establece un destino celular de tricoblasto en la célula epidérmica y comienza la activación de la expresión del factor de transcripción maestro *Root Hair Defective6-like4* (RSL4) para la formación del pelo radical. Entre los muchos genes blanco de RSL4 asociados a la formación del pelo radical, se encuentra el gen que codifica para la Expansina7 (EXP7) utilizado como marcador de tricoblastos diferenciados.

Para comprobar que el adelantamiento del destino celular de tricoblastos y la formación de pelo radical en células epidérmicas adyacentes es generado por la represión del modulador GL2, y en consecuencia, por la expresión anormal de los factores RHD6 y RSL4, se observó la expresión de estos factores fusionados a la proteína fluorescente GFP en presencia de β -Glc-Y. Para ello se utilizaron plantas crecidas en presencia de β -Glc-Y, que expresan individualmente las proteínas GL2, RHD6 y RSL4 fusionadas cada una a GFP, bajo el control de la expresión de su propio promotor endógeno (GL2p::GL2-GFP; RHD6p::RHD6-GFP; RSL4p::RSL4-GFP). Adicionalmente fue observada la expresión de EXP7 en plantas crecidas con β -Glc-Y, que expresan una construcción reportera del promotor endógeno que codifica para EXP7 río arriba de GFP con una señal de localización nuclear (EXP7p::nGFP). Como tratamiento de control las plantas fueron crecidas con el reactivo α -Man-Y, y luego, fue observada la expresión de los factores en la zona meristemática (MZ) y en la zona de elongación (EZ) de las raíces (**Figura 28R**).

El perfil de expresión de GL2 coincide con las células epidérmicas con un destino celular de atricoblasto. En cambio los factores RHD6 y RSL4 son expresados en las células epidérmicas, luego de la represión de GL2 por la kinasa BIN2, con un destino celular de tricoblasto. El promotor de EXP7 se expresa en las células que han comenzado la elongación del pelo radical. El bloqueo de los AGPs por tratamiento con β -Glc-Y, provoca la presencia de RHD6-GFP en todas las células de la epidermis, consistente con la ausencia de GL2-GFP registrada. Los mayores niveles de expresión de RSL4-GFP y del marcador de EXP7 son observados en células epidérmicas adyacentes que forman pelos radicales (**Figura 28R-B y C, flechas blancas**).



E



El efecto del bloqueo de los AGPs por β -Glc-Y reprime completamente la expresión de GL2 probablemente por activación de BIN2, dado que tanto la mutante de ganancia de función *bin2-1*, así como la triple mutante *gskII* resultaron insensibles al β -Glc-Y. BIN2 tiene la capacidad de fosforilar el complejo WER-TTG1-EGL3, y a consecuencia de ello reprimir la expresión de GL2. La ausencia de GL2 promueve la formación del pelo radical por la expresión de RHD6, RSL4 y EXP7 en las células epidérmicas. La represión de GL2 en una célula desencadena el destino tricoblasto. De forma similar, es muy probable que la falta del AGP21 al igual que la presencia de versiones truncadas del *O*-arabinogalactano del tipo II desencadene la formación del pelo radical mediante promoción de la actividad de BIN2 en células adyacentes de la epidermis. La conversión de un atricoblasto en tricoblasto explica el fenotipo de pelos radicales adyacentes en la epidermis descrito por tratamiento con β -Glc-Y (**Figura 1R**).

Cabe señalar que en tricoblastos la kinasa BIN2 está activa y tiene como blanco al factor BZR1, el cual una vez que es fosforilado por BIN2 es reconocido y retenido por proteínas 14-3-3, o enviado a degradación por proteasoma (**Figura 9I**). BZR1 activa la expresión del AGP21, pero observamos que AGP21 se localiza con preferencia en tricoblastos, lo que resulta llamativo si la activación de la transcripción de AGP21 sólo es posible por el factor BZR1 inhibido. Fue demostrado por ChIP-seq que el promotor de AGP21 incluye motivos para la unión de los factores de transcripción ARF6 y PIF4 (Oh, et al., 2014) que combinados generan mayores abundancias de los transcritos de AGP21 (**Tabla 4A**). Los altos niveles de auxinas en los tricoblastos ha sido ampliamente demostrado, e incluso el factor de transcripción RSL4 específico para la formación de pelo radical es activado por auxina (Mangano S, et al., 2017). Una explicación posible es que la expresión de AGP21 sea activada en mayor medida por ARFs que se encuentran en tricoblastos respecto a la activación relativamente menor por BZR1 en atricoblastos, lo que sería manifestado en la preferencia de la localización de AGP21 en tricoblastos (**Figura 13R**).

(Leyenda de la figura de la página anterior)

Figura 28R. El bloqueo de los AGPs produce una distribución anormal de los factores de transcripción de diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos.

A) imágenes de microscopía confocal de raíces de plantas que expresan el factor de transcripción RHD6 fusionado a la proteína verde fluorescente bajo su propio promotor endógeno (RHD6p::RHD6-GFP), en condiciones de control (+ α -Man-Y) o luego del tratamiento con β -Glc-Yariv (+ β -Glc-Y). **B)** imágenes de microscopía confocal de raíces de plantas que expresan el factor de transcripción RSL4 fusionado a la proteína verde fluorescente bajo su propio promotor endógeno (RSL4p::RSL4-GFP), en condiciones de control (+ α -Man-Y) o luego del tratamiento con β -Glc-Yariv (+ β -Glc-Y). **C)** imágenes de microscopía confocal de raíces de plantas que expresan el factor de transcripción GL2 fusionado a la proteína verde fluorescente bajo su propio promotor endógeno (GL2p::GL2-GFP), en condiciones de control (+ α -Man-Y) o luego del tratamiento con β -Glc-Yariv (+ β -Glc-Y). **D)** imágenes de microscopía confocal de raíces de plantas que expresan la proteína verde fluorescente con localización nuclear bajo el promotor endógeno de EXP7 (EXP7p::nGFP), en condiciones de control (+ α -Man-Y) o luego del tratamiento con β -Glc-Yariv (+ β -Glc-Y). **E)** Modelo parcial para el establecimiento del destino tricoblasto por inhibición de GL2, luego del bloqueo de los AGPs por tratamiento con β -Glc-Yariv, o por presencia de los inhibidores de la hidroxilación de prolinas necesaria para la posterior *O*-glicosilación de los AGPs. En todos los casos las plantas fueron crecidas durante 7 días, Escalas 100 μ m.

4.4.4 La localización en tricoblastos del factor RHD6 es promovida por BR.

Para analizar si el agregado de la forma más activa de brasinoesteroide, el brasinólido (BL), tiene la capacidad de inactivar a BIN2 en todas las células epidérmicas, con el consecuente aumento en la expresión de GL2 y la posterior inhibición de RHD6. Fueron crecidas plantas que expresan la proteína de fusión fluorescente bajo el propio promotor endógeno RHD6p::RHD6-GFP en presencia de BL o β -Glc-Y. En las raíces tratadas con BL la expresión de RHD6 se localizó con una considerable especificidad en los tricoblastos. De hecho en las células epidérmicas maduras parece que RHD6 mantuviera niveles de expresión mayores que en el control. Esto demuestra que el destino celular de atricoblasto modulado por la activación de GL2, mediante la inhibición de BIN2 con BL, no sucede en las células epidérmicas con destino de tricoblasto (**Figura 29R**).

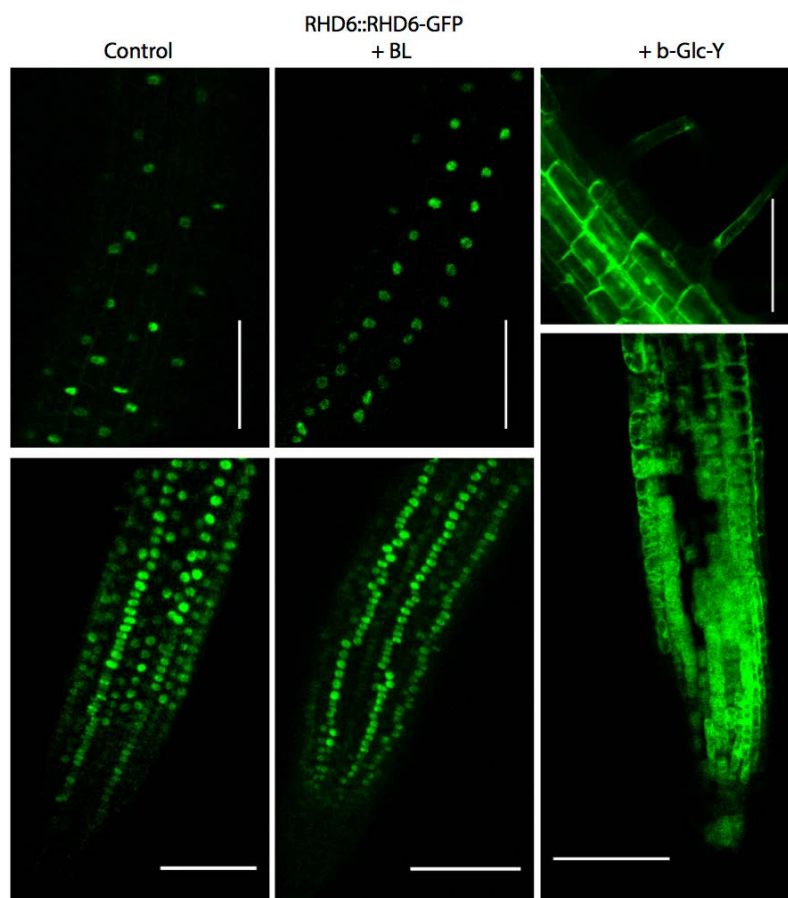


Figura 29R. La expresión del factor de transcripción RHD6 es mayor al bloquear los AGPs, y es limitada por la activación de la vía de brasinoesteroides.

Imágenes de microscopía confocal de raíces de plantas que expresan el factor de transcripción RHD6 fusionado a la proteína verde fluorescente bajo su propio promotor endógeno (RHD6p::RHD6-GFP), en condiciones de control, luego del tratamiento con β -Glc-Yariv (+ β -Glc-Y) o luego del tratamiento con brasinólido (+BL). Se observa que la distribución de la señal fluorescente es limitada a pocas filas de células por el agregado de BL, mientras que el bloqueo de AGPs por β -Glc-Y produce una distribución anormal de la señal en todas las filas de células epidérmicas. En todos los casos las plantas fueron crecidas durante 7 días, Escalas 100 μ m.

5. DISCUSION Y PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 EL BLOQUEO DE LOS ARABINOGALACTANOS ALTERA EL DESTINO CELULAR EN LA RAÍZ DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

En este trabajo inicialmente se pudo observar que el bloqueo de los arabinogalactanos tipo II por el reactivo específico β -Glc-Yariv desencadena la formación ectópica de pelos radicales en células epidérmicas adyacentes. El mencionado fenotipo es el resultado de una alteración en el programa de desarrollo para la raíz, que hasta el momento no ha sido asociado con la falta o alteración de los *O*-arabinogalactanos del tipo II presentes únicamente en las *O*-glicoproteínas de la familia AGP de *Arabidopsis thaliana*. Adicionalmente se comprobó que el bloqueo de arabinogalactanos tipo II de AGPs produce un fenotipo de adelantamiento de la aparición del primer pelo radical como resultado de la reducción en el número de células en la zona meristemática de la raíz y de la inhibición de la expansión longitudinal en las células epidérmicas (**Figuras 1R y 2R**).

A diferencia de los *N*-glicanos, el *O*-arabinogalactano del tipo II es generado en forma secuencial sobre el péptido de AGP, una vez reconocido el motivo peptídico de prolina dispuesta de forma no-contigua (Kieliszewski MJ, et al., 1994; Zhao ZD, et al., 2002). El primer paso necesario en la biosíntesis del *O*-arabinogalactano es la hidroxilación de los residuos de prolina por actividad enzimática Prolil 4-hidroxilasa (P4H) (**Figura 2I**). La inhibición de la hidroxilación de prolina por presencia de los inhibidores DP o EDHB, así como la deficiencia en la actividad P4H en las plantas mutantes *p4h2,p4h5,p4h13* produce el aumento del porcentaje de pelos radicales adyacentes en las células epidérmicas, así como la aparición anticipada de los pelos radicales (**Figuras 3R, 4R y 8R**). Así mismo, la disminución de la longitud máxima de las células epidérmicas expandidas y la reducción en el número de células de la ZM y de la ZE (**Figuras 5R, 6R y 9R**). El IC₅₀ es menor para cada fenotipo analizado con el reactivo β -Glc-Y, que con DP y EDHB, permitiendo sugerir que el bloqueo del *O*-arabinogalactano produce un impacto mayor en el programa de desarrollo para la raíz que inhibición de la hidroxilación de prolina (**Tabla 1R**). Esto indicaría que dentro de la superfamilia de Proteínas Ricas en Hidroxiprolina (HRGPs) que son los sustratos de la actividad P4H, el bloqueo de los AGPs desencadena los fenotipos alterados en el desarrollo de la raíz.

El comienzo de la biosíntesis del *O*-arabinogalactano tiene lugar en la hidroxiprolina no-contigua en el péptido del AGP. Han sido identificadas enzimas que catalizan la Hidroxiprolil-galactosilación (HPTG) cuya falta en las plantas triple mutantes *hptg1,hptg2,hptg3* presentan fenotipos de desarrollo alterado de la raíz (Allan M. Showalter & Debarati Basu, 2016). En los AGPs la cadena principal del *O*-arabinogalactano esta constituida por (1→3) β -galacto-oligosacáridos que son reconocidos por el reactivo β -Glc-Y (Kitazawa, et al., 2013) (**Tabla 1A**). La (1→6) β -galactosil-transferasa 29A (GALT29A) es responsable de la ramificación en el *O*-arabinogalactano (Dilokpimol et al., 2014), mientras que una de las enzimas identificadas que decoran el AGP es la (1→3) α -arabinosil-transferasa *Reduced Arabinose Yariv1* (RAY1) (Gille et al., 2013) (**Figura 7R**).

Los AGPs incluyen formas truncadas del *O*-arabinogalactano por la falta de las ramificaciones (1→6) β-galactano en plantas mutantes del gen que codifica para la GALT29A (*gt29-1*), así como, *O*-arabinogalactanos no decorados con (1→3) α-arabinanos en la planta mutante *ray1*. En estas dos mutantes se manifiestan los defectos en el desarrollo de la raíz de mayor porcentaje de células epidérmicas adyacentes que forman pelos y una menor distancia de aparición del primer pelo radical, esperados por la falta de AGPs con estructuras completas (**Figuras 8R y 9R**).

5.2 LA AUSENCIA DEL PÉPTIDO AGP21 PROMUEVE EL DESTINO TRICOBLASTO

El objetivo general propuesto para esta Tesis fue el de “Determinar el rol biológico del AGP21 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*”. Para cumplir ese objetivo fue necesario identificar el AGP21 dentro de toda la familia de AGPs. La familia de los AGPs en la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* esta constituida por más de 40 genes, de los cuales 13 codifican para AG péptidos (Gaspar, et al., 2001) (**Figura 4I**). Los AG péptidos maduros constan del *O*-arabinogalactano unido al motivo de prolinas no-contiguas en un *backbone* proteico de 10 a 13 aminoácidos solamente, lo que los hace ideales para asociar el rol biológico hallado con el *O*-arabinogalactano.

Los AG péptidos AGP15, AGP20 y AGP21 llamaron la atención en la búsqueda inicial por mutantes de T-ADN de los genes que codifican para AGPs con *O*-arabinogalactanos tipo II, por presentar el aumento del porcentaje de pelos radicales adyacentes en las células epidérmicas. Las plantas mutantes *agp21* manifestaron los fenotipos con mayor alteración para el desarrollo de la raíz, incluso las dobles mutantes *agp15,agp21* y *agp20,agp21* no presentaron fenotipos más drásticos que la simple mutante *agp21* (**Figuras 11R y 12R**), sugiriendo que la falta del AG péptido AGP21 desencadena una alteración en el programa de desarrollo para la raíz.

En las plántulas WT, el AGP21 se encuentra entre los AGPs más ubicuamente expresados, y además en la raíz los niveles de transcripción son más abundantes en la zona de elongación, acorde a la zona en que se define el destino celular tricoblasto/atricoblasto (**Figura 10R**). Por ello se decidió utilizar AGP21 como la glicoproteína modelo para el estudio del rol biológico del *O*-arabinogalactano del tipo II en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La formación ectópica de pelos radicales en células epidérmicas adyacentes observada en la raíz de *agp21*, fue complementada al fenotipo WT por la restauración del AGP21 bajo la regulación de la región promotora de 1,5 Kbp (AGP21p::V-AGP21), demostrando el rol biológico que tiene AGP21 para la regulación del destino celular en la epidermis de la raíz (**Figura 14R**).

La proteína AGP21 fusionada a la proteína fluorescente Venus presentó un perfil de expresión preferente en los tricoblastos de la raíz (**Figura 13R**), tanto en condiciones de control como al desencadenar la formación ectópica de pelos radicales por tratamiento con el reactivo β -Glc-Y (**Figura 19R**). Por el contrario, la sobreexpresión de AGP21 no desencadena la formación ectópica de pelos radicales (**Figura 14R**). Lo que sugiere que la expresión de AGP21 es regulada por la vía de señalización que promueve la formación del pelo radical y la expansión celular en la epidermis. Por otra parte, el destino celular de tricoblasto es desencadenado en algunos atricoblastos, por la falta de AGP21 y en mayor medida por el bloqueo general de *O*-arabinogalactanos de tipo II de los AGPs.

La sobreexpresión de la proteína de fusión Venus-AGP21 bajo el control del promotor constitutivo 35S en plantas mutantes *agp21* (*agp21/35-Sp::V-AGP21*) no logra complementar totalmente el número de células de la zona meristemática y de elongación, pero esto no parece afectar la complementación del fenotipo de aparición adelantada del primer pelo radical (**Figuras 13R y 14R**). Indicando que el nivel endógeno en que AGP21 es expresado es suficiente para la formación normal del pelo radical y la completa expansión celular en la epidermis.

Cuando se analizó el peso molecular de la proteína de fusión Venus-AGP21 se determinó una banda de mayor intensidad que correspondería a V-AGP21 completamente *O*-glicosilado en sus tres residuos de Hyp, alrededor de los 100-120 kDa. Además fueron reveladas dos bandas de menor intensidad con un peso molecular de alrededor de 80 y 60 kDa, que corresponderían al AGP21 *O*-glicosilado en dos de los tres residuos de Hyp y en uno de los tres residuos de Hyp, en cada caso (**Figura 17R**). El peso molecular esperado para Venus-AGP21 no glicosilado es de 30 kDa, que fue revelado en una banda de muy baja intensidad, sugiriendo que la población de AGP21 sin modificar postraduccionalmente es muy baja. Resulta necesario caracterizar con mayor detalle a nivel bioquímico el patrón de glicosilación de AGP21.

El modelado por dinámica molecular del AGP21 *O*-glicosilado con un arabinogalactano consenso de 15 azúcares, sugiere que la *O*-arabinogalactosilación del péptido AGP21 promueve su estabilidad conformacional. Además, se pudo determinar que en estados de una mayor glicosilación las cadenas del arabinogalactano se ubican siempre en la misma orientación con relación al péptido (**Figura 21R**). El AGP21 es una glicoproteína de alto peso molecular que se encontraría unida a la membrana plasmática por un ancla de GPI (Borner, et al., 2003). La señal fluorescente de Venus-AGP21 mantenida en la membrana plasmática luego de la retracción por plasmólisis (**Figura 18R**), indicaría que AGP21 se encuentra mayoritariamente unido a la membrana por un ancla de GPI, luego de transitar a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi donde sería modificado postraduccionalmente con la *O*-arabinogalactosilación.

Llamativamente, cuando las plántulas son crecidas en presencia de β -Glc-Yariv, la relación de intensidad de fluorescencia de Venus-AGP21 en la membrana plasmática respecto al interior celular aumenta (**Figura 19R, flechas rojas**), siendo posible que β -Glc-Yariv interactúe con el AGP21, bloqueándolo y desplazando un equilibrio dinámico hacia la mayor secreción de AGP21 desde vesículas u organelas celulares. Lo que daría por resultado la acumulación del AGP21 en la membrana plasmática.

Mediante experimentos de recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueo (FRAP), se determinó que el AGP21 posiblemente anclado a GPI tiene una capacidad de difusión lateral en la membrana plasmática de la epidermis ($Y_{60}=17,9\%$), similar al determinado para el AGP4 clásico con una cadena principal de 135 aminoácidos anclado a GPI ($Y_{60}=20,0\%$), y menor que la obtenida para GFP-GPI ($Y_{60}=26,6\%$) (Martinière, et al., 2012). Ambas determinaciones fueron realizadas en especies vegetales diferentes lo que no permite una comparación directa, pero en términos generales es posible que los AGPs anclados a membrana por GPI tengan una capacidad de difusión lateral similar (**Figura 20R**).

5.3 LOS BRASINOESTEROIDES REGULAN LA EXPRESION DE AGP21

La señalización por brasinoesteroides (BRs) controla el destino celular en la epidermis radical, modulando la actividad de la kinasa BIN2 que cuando es activa inhibe la expresión del factor de transcripción GL2 (Kuppusamy et al., 2009; Cheng et al., 2014), promoviendo la formación del pelo radical. En las plantas mutantes *bri1-116* para el receptor de BR, se desencadena la formación ectópica de pelos radicales en células epidérmicas adyacentes (**Figura 22R**) curiosamente similar al producido por tratamiento con β -Glc-Y (**Figura 1R**). De forma similar, la expansión disminuida de las células epidérmicas, junto con el reducido número de células, se manifiesta en la aparición temprana de los primeros pelos radicales en las plantas *bri1-116* (**Figura 22R y Figura 23R**).

Los AG péptidos AGP12, AGP13, AGP14, AGP21, AGP24 filogenéticamente cercanos entre sí (Ma H et al., 2010), son regulados por el factor de transcripción BZR1 e inducidos a su expresión por BR (**Tabla 3A**). A su vez, los genes que codifican para estos AGPs están altamente expresados en la ZE de la raíz (**Figura 10R-A**). En este trabajo se comprobó que AGP21 participa en el proceso de expansión celular en la epidermis de la raíz (**Figura 15R**), donde su expresión es aumentada por la hormona BR (**Figuras 24R y 25R**).

La localización preferencial de AGP21 en las células epidérmicas que desarrollan el pelo radical (**Figura 13R**) o por el tratamiento con β -Glc-Y (**Figura 19R**), es también observado en plantas *bri1-116/AGP21p::GFP*, cuya localización del reportero GFP del promotor de AGP21 es observada en dos células epidérmicas adyacentes que han comenzado a formar el pelo radical (**Figura 25R**). Esto indica que AGP21 se expresa incluso cuando la vía de BR está inactiva por la falta del receptor BRI1. Es consistente con la regulación de AGP21 por una vía adicional a BRs, la disminución significativa de la señal fluorescente del factor BZR1-YFP en las células de la raíz por tratamiento con β -Glc-Y (**Figura 26R**), ya que β -Glc-Y no impidió que la proteína de fusión Venus-AGP21 fuera expresada y localizada en tricoblastos (**Figura 19R**). Utilizando hipocotilos crecidos en oscuridad, fue demostrado que el factor de transcripción ARF6 de la vía de Auxinas, y el factor de transcripción PIF4 regulado por el Fitocromo B (PhyB) de la respuesta de escape al sombreado, se unen al promotor del gen que codifica para AGP21 (Oh, et al., 2014) (**Tabla 4A**). Es posible que los factores de transcripción ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 de la vía de Auxinas (Mangano S, et al., 2017) regulen así mismo la expresión de AGP21 en tricoblastos, en forma conjunta o independiente a la expresión por BR.

El bloqueo de los AGPs por tratamiento con β -Glc-Y desencadena una alteración en el destino celular de la epidermis radical (**Figura 1R**). Entre los AG péptidos de *Arabidopsis*, se ha identificado al AGP21 como relevante para el normal establecimiento del destino tricoblasto en la raíz (**Figura 14R**). Ha sido confirmado que la expresión del AGP21 es modulada por la vía de brasinoesteroides, a través del factor de transcripción BZR1 (**Figura 24R**). De manera complementaria, la disrupción general de la vía de BRs en las plantas *bri1-116* resulta en la alteración en el destino celular de la epidermis radical (**Figura 22R**) con la localización atípica de AGP21 en células epidérmicas adyacentes (**Figura 25R**), de manera muy similar a la observada por el bloqueo de AGPs con β -Glc-Y (**Figura 19R**).

5.4 LOS FACTORES QUE DEFINEN EL DESTINO CELULAR EN LA EPIDERMIS RADICAL SON AFECTADOS POR EL BLOQUEO DE AGPs

El fenotipo del destino tricoblasto exacerbado en la raíz causado por la ausencia de la molécula donora del azúcar D-galactosa en la mutante *reb1-1*, sugiere que los AGPs cumplirían un rol importante para el establecimiento del programa de destino celular en la epidermis radical de *Arabidopsis* (**Figura 6I**). Todas las células de la epidermis potencialmente pueden seguir un destino tricoblasto y formar un pelo radical, pero el programa de desarrollo de la raíz establece una fila de células epidérmicas con destino tricoblasto alternada con una o más filas de células epidérmicas con destino atricoblasto (Kwak et al., 2014; Schiefelbein et al., 2014). Existe una regulación conjunta entre las células epidérmicas adyacentes para seguir destinos celulares opuestos que incluye la migración intercelular de factores (**Figura 8I**) y la regulación de algunos componentes en la vía de Brasinoesteroide (**Figura 11I**).

La importancia de la vía de Brasinoesteroide (BR) en el proceso de expansión celular ha sido estudiada previamente. Así como la necesidad de BR para el correcto desarrollo de la raíz, especialmente al ser identificados los factores WER y TTG1 del destino celular atricoblasto, que son inhibidos por BIN2 (Cheng et al., 2014). Cuando la vía de BR es inactiva en plantas *bri1-116*, se desencadena la formación ectópica de pelos radicales como resultado del establecimiento del destino tricoblasto anormal en la epidermis de la raíz (**Figura 22R**). Acorde a eso, el bloqueo de los AGPs por β -Glc-Y desencadena la formación ectópica de pelos radicales reprimiendo la vía de BR cuya evidencia es la disminución de los niveles del factor BZR1 y el cambio en su perfil de expresión en la epidermis, por presencia de β -Glc-Y (**Figura 26R**). La represión de BZR1 es llevada a cabo por la actividad kinasa de BIN2, que responde al bloqueo de AGPs por β -Glc-Y de forma dosis dependiente. En plantas mutantes de ganancia de función para BIN2 no se observó sensibilidad al β -Glc-Y, dado que la vía de BR es constitutivamente inactiva. Indicando que el bloqueo de AGPs por β -Glc-Y activa la kinasa BIN2 modificando el destino atricoblasto en células adyacentes a los tricoblastos, desencadenando la formación ectópica de los pelos radicales (**Figura 27R**).

Dado que la actividad de BIN2 puede ser activada por la inhibición de los receptores de membrana BRI1 y SERK3 (He J-X, et al., 2002; Vert & Chory, 2006; Yan Z, et al., 2009), es posible que haya AGPs asociados a los receptores BRI1 y/o SERK3 que reconocen de forma deficiente a BR cuando los AGPs son bloqueados por β -Glc-Y. El AGP21 expresado en tricoblastos (**Figura 25R**) podría promover la interacción de BR a sus receptores en membrana plasmática participando en el mantenimiento de los niveles de BZR1 en tricoblastos (**Figura 26R**), pero sin provocar la inhibición de BIN2 cuya actividad kinasa es necesaria para el establecimiento del destino celular tricoblasto (**Figura 11I**). BIN2 tiene la capacidad de fosforilar el complejo WER-TTG1-EGL3, y reprimir la expresión de GL2 (Cheng et al., 2014; Kuppusamy et al., 2009). Al no encontrarse GL2 los factores de transcripción RHD6 y RSL4 son expresados de forma constitutiva en las células de la epidermis radical (Masucci & Schiefelbein, 1994; Menand et al., 2007; Lin et al., 2015). RHD6 y RSL4 promueven el establecimiento del destino tricoblasto por activación de la expresión de numerosos genes necesarios para la formación del pelo radical, como EXP7 (Yi K, et al., 2010).

La presencia del factor de transcripción GL2 inhibe la expresión del factor RHD6 que controla el destino celular tricoblasto. Cuando son bloqueados los AGPs por β -Glc-Y no es detectada la presencia de GL2 en células con destino atricoblasto. Consecuentemente, β -Glc-Yariv desencadena la alteración en el programa de desarrollo para la raíz, a través de la expresión constitutiva del factor RHD6 del destino tricoblasto, y la expresión adelantada de RSL4 consistente con la aparición adelantada del pelo radical (**Figura 28R**). El factor RSL4 activa la expresión de EXP7 en células epidérmicas adyacentes que han comenzado con la formación ectópica del pelo radical. Esto demuestra el efecto general que produce el bloqueo de AGPs en la desregulación del destino celular y el establecimiento anormal del destino tricoblasto en la epidermis de la raíz.

La vía de BR es indispensable para mantener el destino atricoblasto en las filas alternadas de células en la epidermis de la raíz. El agregado exógeno de BR no inhibe la formación del pelo radical, aunque regula la expresión del factor del destino tricoblasto RHD6 limitando su localización en filas de células epidérmicas bien definidas (**Figura 29R**). El factor GL2 activo está presente en las células epidérmicas con destino atricoblasto, gracias a la inhibición de BIN2 por activación de la vía de BRs (Vert & Chory, 2006; Yan Z, et al., 2009).

A medida que el desarrollo de la raíz avanza en cada fila de células de la epidermis se define un destino celular de tricoblasto si BIN2 es activa, o atricoblasto si BIN2 es inactiva. Los resultados indican que el establecimiento del programa de destino celular en la raíz de *Arabidopsis* tiene lugar desde la zona meristemática con la expresión alternada de los factores GL2 en atricoblastos y RHD6 preferentemente en tricoblastos. La falta del AGP21 podría impactar en la activación de BIN2 desencadenando la formación de pelos radicales ectópicos en atricoblastos. Dicha alteración en el programa de desarrollo de la raíz es generalizada cuando se produce el bloqueo masivo de los AGPs por presencia del reactivo β -Glc-Y. El bloqueo de AGPs desencadenaría el cambio en los perfiles de expresión de los factores RHD6, RSL4, GL2 del destino celular, provocados por la activación constitutiva de la kinasa BIN2 en las células epidérmicas de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (**Figura 1D**).

En esta Tesis se determinó el rol biológico del AG péptido AGP21 para el programa de desarrollo de la raíz responsable de la formación del pelo radical. Este involucra la vía de señalización hormonal de Brasinoesteroides junto con los factores del establecimiento del destino celular tricoblasto/atricoblasto, mediado por la presencia del *O*-arabinogalactano asociado a un pequeño péptido unido a la membrana plasmática celular.

Las conclusiones obtenidas en esta Tesis abren nuevos interrogantes respecto a la co-localización y posible interacción física de AGP21 con los receptores de Brasinoesteroides BRI1 y SERK3 en la membrana plasmática de las células epidérmicas. Futuros estudios son necesarios para determinar si el AGP21 actúa directamente sobre los receptores de BRI1 y SERK3 afectando la percepción de BR en la célula. En ese caso, el AGP21 al modular la percepción de BR por los receptores, generando una regulación *río abajo* de la propia expresión de AGP21 mediante el factor BZR1. Así mismo, sería interesante evaluar si existe un conglomerado entre AGP21 y otros AG péptidos co-expresados que podrían participar en la misma vía de señalización.

Finalmente, resulta interesante definir si la perturbación del AGP21 produce la alteración en la localización de los factores de transcripción del destino celular responsables de la regulación de GL2, como los miembros del complejo WER-TTG1-EGL3.

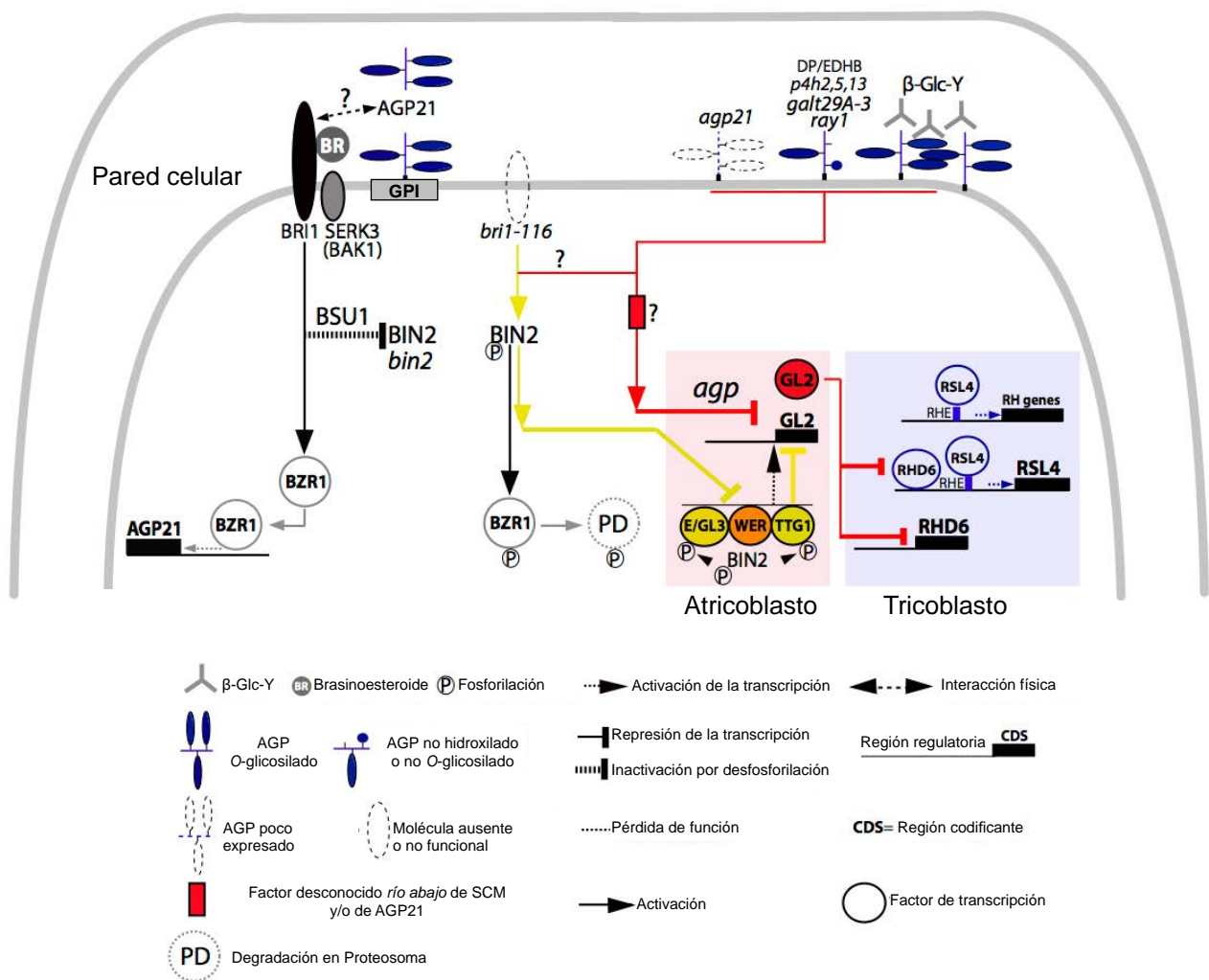


Figura 1D. Modelo de diferenciación de las células epidérmicas en tricoblastos.

Esquema en que se representa como en la vía de brasinoesteroides BR interactúa con su receptor BRI1 y el co-receptor SERK3, activando la expresión de BSU1, que a su vez inhibe a la kinasa BIN2, permitiendo la des-represión del factor BZR1 que activa la expresión del AGP21. Con la vía de BR activa, BIN2 no es capaz de fosforilar el complejo WER-TTG1-EGL3, y por lo tanto la expresión de GL2 es activa. GL2 reprime la expresión de RHD6 y RSL4, estableciéndose el destino celular de atricoblasto.

La falta del AGP21, así como la biosíntesis truncada del O-arabinogalactano, o el bloqueo de los AGPs por el reactivo β -Glc-Y, impactan en un componente desconocido que activa la kinasa BIN2. BIN2 activa tiene la capacidad de fosforilar a WER y TTG1 (Cheng et al., 2014) en el complejo WER-TTG1-EGL3, reprimiendo la expresión de GL2. Al no expresarse GL2 el factor de transcripción RHD6 y su target río abajo RSL4, son expresados de forma constitutiva en las células de la epidermis radical. RHD6 y RSL4 promueven el establecimiento del destino tricoblasto por activación de la expresión de numerosos genes necesarios para la formación del pelo radical (Yi K, et al., 2010).

6. ANEXOS

Tabla 1A. Reactividad del β -Glc-Y con (1 \rightarrow 3) β -galactanos del tipo AGP.

Reactividad relativa de galacto-oligosacáridos con el β -Glc-Y	
Sustrato	% formación de complejo β 1 \rightarrow 3-Gal/ β -Glc-Y
β -1,3-Gal ₄	0
β -1,3-Gal ₅	0
β -1,3-Gal ₆	0
β -1,3-Gal ₇	13
β -1,3-Gal ₈	68
β -1,3-Gal ₉	100
β -1,6-Gal _{>6}	0

Tabla 1A. Reactividad contra el reactivo β -Glc-Y de cadenas galacto-oligosacárido del tipo AGP, con diferente número de (1 \rightarrow 3) β -Gal. La reactividad se expresa en % de formación de halo precipitado en agar del complejo (1 \rightarrow 3) β -Gal/ β -Glc-Y (adaptado de Kitazawa, et al., 2013).

Tabla 2A. Promedio de ángulos ζ durante las simulaciones de dinámica molecular.

Peptide state	ζ angle 1 Ala1-Pro2-Ala3-Pro4	ζ angle 2 Pro2-Ala3-Pro4-Ser5	ζ angle 3 Ala3-Pro4-Ser5-Pro6	ζ angle 4 Pro4-Ser5-Pro6-Thr7	ζ angle 5 Ser5-Pro6-Thr7-Ser8
non-Glyco, Pro	-124 \pm 46	-125 \pm 31	-130 \pm 49	-130 \pm 31	-149 \pm 49
non-Glyco, Hyp	-130 \pm 47	-125 \pm 31	-133 \pm 46	-128 \pm 32	-150 \pm 51
Glyco4	-116 \pm 40	-128 \pm 29	-134 \pm 44	-123 \pm 29	-149 \pm 50
Glyco6	-116 \pm 49	-121 \pm 31	-96 \pm 24	-121 \pm 27	-151 \pm 45
Glyco2	-140 \pm 31	-108 \pm 25	-96 \pm 26	-121 \pm 28	-146 \pm 49
Glyco4,6	-140 \pm 51	-118 \pm 27	-124 \pm 24	-137 \pm 29	-148 \pm 45
Glyco2,4	-84 \pm 18	-128 \pm 27	-151 \pm 34	-143 \pm 30	-147 \pm 48
Glyco2,6	-88 \pm 22	-105 \pm 18	-135 \pm 21	-144 \pm 22	-148 \pm 46
Glyco2,4,6	-112 \pm 25	-175 \pm 16	-168 \pm 22	-150 \pm 21	-131 \pm 43

Tabla 2A. Promedio de ángulos ζ durante las simulaciones de dinámica molecular. Los valores promedios aparecen junto \pm desviación estándar determinados (50 a 100 nanosegundos).

Tabla 3A. Regulación de AGPs por la vía de Brasinoesteroide y los factores ARF6 y PIF4.

AGI	Microarray		RNA-seq		ChIP-seq		
	<i>bri1-116 bzr1-D/</i> <i>bri1-116</i> ratio	<i>bri1-116/</i> <i>Col</i> ratio	WT +BL / WT -BL	<i>iaa3</i> +BL / <i>iaa3</i> -BL	BZR1	ARF6	PIF4
AGP13	21,03	0,04	45,64	1,92	ne	ne	ne
AGP22	13,70	0,05	150,74	3,25	ne	ne	ne
AGP14	8,24	0,06	3,71	1,27	ne	ne	ne
AGP4	7,64	0,15	10,78	2,43	4,69	3,01	8,81
AGP2	3,56	0,37	3,59	0,96	ne	ne	ne
AGP24	3,04	0,29	4,68	1,04	ne	ne	ne
AGP21	1,93	0,43	7,81	1,27	4,03	2,9	12,96
AGP7	1,81	0,48	2,42	1,01	3,61	ne	16,51
AGP18	1,71	0,47	2,70	1,18	8,83	ne	ne
AGP12	1,35	0,61	2,18	1,02	5,17	3,79	26,00
AGP9	1,09	0,61	4,34	1,09	5,82	ne	14,14
AGP23	0,47	1,39	ne	ne	ne	ne	ne
AGP26	0,40	1,58	ne	ne	ne	ne	10,58
AGP20	0,21	1,54	ne	ne	ne	ne	13,75
AGP15	ne	ne	1,56	1,15	4,89	3,79	14,34
AGP17	ne	ne	0,47	0,93	5,37	3,79	14,14

Tabla 3A. Genes que codifican para AGPs expresados de forma diferencial, determinados por microarray, en mutantes del receptor de BR *bri1-116* respecto al control *Col*; y en plantas BZR1 constitutivamente activo (*bzr1-D*, *bri1-116*) respecto a plantas *bri1-116* (Columnas 1 y 2. Adaptado de Yu Sun, et al. *Developmental Cell*, 2010). Cociente entre la abundancia de los transcritos determinados por RNA-seq de plantas WT (o mutantes *iaa3*) luego del tratamiento con brasinólido (BL) respecto al WT (o mutantes *iaa3*) sin tratar (Columnas 3 y 4. Oh, et al. *eLife*, 2014). Preferencia de unión de los factores de transcripción BZR1 y ARF6 determinado por ChIP-seq (columnas 5 y 6. Adaptado de Oh, et al. *eLife*, 2014). Preferencia de unión del factor de transcripción PIF4 determinado por ChIP-seq (columna 7. Adaptado de Oh, et al., 2012).

Se muestran los AGPs mayormente expresados por tratamiento con BL en plantas WT en orden descendente según los niveles de transcritos determinados por RNA-seq. Se destacan en negrita los AGPs que resultan altamente expresados en la zona de elongación de la raíz según datos en Genevestigator (Figura 12R). Todas las determinaciones fueron realizadas a partir de hipocotilos crecidos en oscuridad durante 5 días, ne= secuencia no encontrada.

Tabla 4A. Los factores ARF6, BZR1 y PIF4 se unen al promotor del gen AGP21.

Factores	>3Kbp	3Kbp>2Kbp	1Kbp>+1	+1>1Kbp	1Kbp<
ARF6	2,9	0	0	0	2,78
BZR1	0	0	4,03	0	0
PIF4	12,96	6,24	8,81	10,19	10,98

Tabla 4A. Experimentos de Chip-seq para los factores de transcripción ARF6, BZR1 y PIF4 según la región promotora del gen que codifica para el AGP21. Se indican los valores obtenidos por ChIP-seq correspondientes a la región de 3Kbp río arriba del sitio +1 de comienzo de la transcripción (>3Kbp), región entre 3Kbp y 2Kbp río arriba del sitio +1 de comienzo de la transcripción (3Kbp>2Kbp), región entre 1Kbp río arriba y el sitio +1 de comienzo de la transcripción (1Kbp>+1), región entre 1Kbp río abajo y sitio +1 de comienzo de la transcripción (+1>1Kbp), región de más de 1Kbp río abajo del sitio +1 de comienzo de la transcripción (1Kbp<) (adaptado de Oh, et al.eLife, 2014).

Tabla 5A. AGPs regulados por el factor de transcripción de la vía de Brasinoesteroides, BZR1.

AGI	Gen	Referencia
AT5G65390	AGP7	Yu Sun, et al.Developmental Cell (2010). Nemhauser et.al PLoS Biol. (2004). Vert et.al Annu Rev Cell Dev Biol (2005). Nemhauser et.al Cell (2006).
AT3G13520	AGP12	Vert et.al Annu Rev Cell Dev Biol (2005).
AT5G11740	AGP15	Nemhauser et.al PLoS Biol. (2004). Vert et.al Annu Rev Cell Dev Biol (2005).
AT2G23130	AGP17	Nemhauser et.al PLoS Biol. (2004). Vert et.al Annu Rev Cell Dev Biol (2005).
AT3G61640	AGP20	Yu Sun, et al.Developmental Cell (2010).
AT1G55330	AGP21	Yu Sun, et al.Developmental Cell (2010). Vert et.al Annu Rev Cell Dev Biol (2005). Nemhauser et.al Cell (2006).

Tabla 5A. AGPs regulados por el factor de transcripción de la vía de Brasinoesteroides BZR1 basado en experimentos de ChIP-chip (inmunoprecipitación de la cromatina y posterior hibridación en microarrays) en plantas BZR1-CFP (Yu Sun, et al.Developmental Cell, 2010); comparación en chip de ATH-arrays de plantas *bri1-116* y WT para los transcritos de cada AGP (Vert et.al Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. Nemhauser et.al PLoS Biol., 2004. Nemhauser et.al, Cell, 2006).

Tabla 6A. Primers utilizados en esta Tesis

Primers para genotipo de mutantes de T-ADN

Mutante T-ADN	Código T-ADN	<i>forward</i> WT	<i>reverse</i> WT
<i>agp15.1</i>	WiscDsLox383F8	CATTTCGATTTAGATCGGTTGG	CGTCGACGTATTTGAAAAAGC
<i>agp15.2</i>	SALK_114736S	GACACGAAAGACGCTGAGATC	AGGAGAAATTTGCACCCATTC
<i>agp20.1</i>	SALK_092212C	TCTGCAATGTTTTTCTGGTCC	TACGCGATTCCTTGATCAATC
<i>agp20.2</i>	SAIL_849_C06	CGTTACATATGTTTCACTCAAAGC	AGGAGCAGGAGCTAAGGATTG
<i>agp21</i>	SALK_140206	TTTGGTGTGAACGTTGGTATG	CAAAAGATGAAACCAGATGCC
<i>gt29-A</i>	SAIL_1259_C01	TTTGTGGCTCGAGTAAACCC	AAGCATGAGATTGTGATTCCG

Primers para RT-PCR

Gen	<i>forward</i> WT	<i>reverse</i> WT
AGP21	GCAATGAAGATGAAGATGATGG	TCAGAAGTTGGGCTTGGAG
PP2A	TCCGAGATCACATGTTCCAAACTC	CCGTATCATGTTCTCCACAACCG

Primers para clonar la secuencia de Venus-AGP21, con los extremos AttB (mayúscula)

<i>forward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCatggaggcaatgaagatg
<i>reverse</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTctcaaaagatgaaaccaga

Tabla 7A. Secuencia clonada de la proteína de fusión Venus-AGP21.

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCatggaggcaatgaagatgaagatgatggtgtttattat
ggtgttgcggtggcttttcagctgccacggctaccatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctg
gacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagctgatctgc
accaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgggctacggcctgcagtgttcgcccgtaccccgaccacatgaa
gcagcagacttcttcaagtccgcatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccgcg
ccgaggtgaagttcagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcaca
agctggagtacaactacaacagccacaacgtctatataccgccgacaagcagaagaacggcatcaaggccaactcaagatccgccacaac
atcgaggacggcggcgtgcagctgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactac
ctgagctaccagtccgccctgagcaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccggggatcactct
cggcatggacgaggcagctgctaccgttgaagctccagctccaagcccaactctgatgctgcatgtttgtaccagcactgtttgcatctgtgtt
gctttggcatctggtttcatcttttgaGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC

Tabla 7A. Secuencia del ADN sintético Venus-AGP21 en que se indica la secuencia codificante para la proteína fluorescente Venus incluida entre la secuencia que codifica para la vía secretoria (resaltado verde) y la secuencia que codifica para el péptido maduro de AGP21 (resaltado naranja), se indica también la secuencia del ancla de GPI (resaltado gris). La secuencia incluye los extremos AttB para la recombinación en vectores de entrada de Gateway (mayúscula). Se indica la secuencia utilizada para el diseño de los *primers* para sub-clonar la secuencia de Venus-AGP21 (subrayado).

Tabla 8A Secuencia clonada de la región promotora del gen que codifica para AGP21.

TAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTcagtcgactggatccgggtaccgaattcgcggccgcgactgcag
ccaagcttgctgattgaccggatcgatctcaaatgagtttcaaaactgcaaatgagattcaaacatattttgaagaaaagtaactagattta
atccaaccaatggccactagattcaagttccaacatggaactcattattatgcttggctcgaaaagtgttaaagttttattttgaaatcactttct
cgttgcggccttgtttaaactacttgctgatctaaaactaaacggctccttctaattcctaaacgacggagaattaaattagtaatgagtagcttta
tgaaaaatcaaaataaaagagagtgaataatcgaaaacaaaagtaacaacaaataatcgatgtttacgggttagggccacaaaagcagt
ccagcctcatgcatatgattatgcataattgatgttggatttgaagctttccagctttttattttgttatctctctcctcggctctgtttgattctttttg
tatatgattttaaaaagcatgctactgatataactaattctttcttttgaattggggtagttggctatttcatagtttgggtgaacgttggtatgaacatc
actaatttcaaggaaactaaaacggctaattgaccttttagtgcaatcagaatagtcataataaaagtaattgttcttaagaaaaaaaattct
tagatagaaggaaaaggagtattctagaatagttttagtaaaaaatgttctccatataataggtttatttttaattaataaaatatatgtttattgaag
aaaaagaaggaaatgatgcttagtaaatgttctcaaaactaagcaaaatctataaattaatattttgtgcgtaaaatattttattaattataaagat
attaactgataaaaagtaactaagacttgatccactttataatctgtggatccgcgagactaagtgattaaattctatgattatatttttcaataac
atattaatgtatttgtataatttatgagtgtactctcaaaataatagtatataaaaaatttttaatacactaaaaaaactatagaattttacttagctca
tctcaatctcatctagagtttggttattaatagtagtaagaatagctaatcttttaataagtagaataaaaacttttaatacaccacaagaagttgat
gtaacttctatccttgaacaactcatgtgaagtcacaaatacaaaatcattacaatcaaaacaaaaattagtaaaaaacgtttttgtgaggttggga
aagaaaaaggacagtggttgagaaaaagaagaatgtggttggccaagagacagccaatttggcagctgtaaaatctcatacaattgttgat
aaatagacaataaccatccccacaactattatcatcacaacacaatcaaaacaagaataacaaaatcttctctataaattcttatttcaagacatca
aaggagaattacggaattcagctcgggtaccggggatcctatggaggcaatgaagatgaagatgatgggtttattatggttgttgcgggtgctt
tctcagctgccacggctgactacaaggatgacgatgacaaggctaccgtgaagctccagctccaagccaactctgatgctgccatgtttgta
ccagcactgttgcactctgttgttgccttggcatctggttcatctttgactcgagatatctagaCCCAGCTTTCTTGTAC

Tabla 8A. Secuencia de la región promotora clonada de 1,5 Kbp río arriba del sitio de inicio de la transcripción para el gen AT1G55330 que codifica para AGP21. Se ha resaltado la secuencia de la vía secretoria (verde), la secuencia que codifica para el péptido maduro de AGP21 (naranja), el ancla de GPI (gris), el motivo de unión a BZR1 E-box: catgtg (azul) y con los extremos AttB para la recombinación en vectores de entrada de Gateway (mayúscula).

7. REFERENCIAS

- Alexopoulos CJ, Mims, CW, and Blackwell, M (1996). *Introductory Mycology*. (4 th ed.). USA: John Wiley and Sons Inc.
- Andème-Onzighi, C., Sivaguru, M., Judy-March, J., Baskin, T.I., and Driouich, A. (2002). The reb1-1 mutation of *Arabidopsis* alters the morphology of trichoblasts, the expression of arabinogalactan-proteins and the organization of cortical microtubules. *Planta* 215 949–958. DOI 10.1007/s00425-002-0836-z
- Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Höfte H, Plazinski J, Birch R et al.,(1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* 279:717–720.
- Back TG, Janzen L, Nakajima SK, Pharis RP. (2000) Effect of chain length and ring size of alkyl and cycloalkyl side-chain substituents upon the biological activity of brassinosteroids. Preparation of novel analogues with activity exceeding that of brassinolide. *J Org Chem*. 2000 May 19;65(10):3047-52.
- Balcerowicz, D., Schoenaers, S., & Vissenberg, K. (2015). Cell Fate Determination and the Switch from Diffuse Growth to Planar Polarity in *Arabidopsis* Root Epidermal Cells. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1163. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.01163>
- Baskin TI, Bertzner AS, Hoggart R, Cork A, Williamson RE (1992) Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust J Plant Physiol* 19:427–437.
- Baskin TI (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review&a model. *Protoplasma* 215:150–171.
- Berendsen HJ, Van Gunsteren WF, Zwinderman HR, Geurtsen RG. (1986) Simulations of proteins in water. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;482:269-86.
- Bernhardt C, Lee MM, Gonzalez A, Zhang F, Lloyd A, Schiefelbein J. (2003) The bHLH genes *GLABRA3* (GL3) and *ENHANCER OF GLABRA3* (EGL3) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development*. 2003 Dec;130(26):6431-9. Epub 2003 Nov 19.
- Borner, G. H. H., Lilley, K. S., Stevens, T. J., & Dupree, P. (2003). Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in *Arabidopsis*. A Proteomic and Genomic Analysis. *Plant Physiology*, 132(2), 568–577. <http://doi.org/10.1104/pp.103.021170>.
- Bowling AJ, Vaughn KC (2008) Structural and immunocytochemical characterization of the adhesive tendril of Virginia creeper (*Parthenocissus quinquefolia* [L.] Planch.). *Protoplasma* 232(3-4):153–163.
- Bruick RK & McKnight SL (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001 Nov 9;294(5545):1337-40. DOI: 10.1126/science.1066373
- Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126, 014101.
- Crawford BC, Ditta G, Yanofsky MF (2007) The *NTT* gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 17(13):1101–1108.

- Chai L & Morris JE (1999). Heparan sulphate in the inner limiting membrane of embryonic chicken retina binds basic fibroblast growth factor to promote axonal outgrowth. *Experimental Neurology*, 160 (1999), pp. 175–185
- Chaiwanon, J., & Wang, Z.-Y. (2015). Spatiotemporal Brassinosteroid Signaling and Antagonism with Auxin Pattern Stem Cell Dynamics in Arabidopsis Roots. *Current Biology : CB*, 25(8), 1031–1042. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.046>
- Cheng Y., Zhu, W., Chen, Y., Ito, S., Asami, T., & Wang, X. (2014). Brassinosteroids control root epidermal cell fate via direct regulation of a MYB-bHLH-WD40 complex by GSK3-like kinases. *eLife*, 3, e02525. <http://doi.org/10.7554/eLife.02525>
- Chevalier D, Batoux M, Fulton L, Pfister K, Yadav RK, Schellenberg M, Schneitz K. (2005) STRUBBELIG defines a receptor kinase-mediated signaling pathway regulating organ development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 21;102(25):9074-9. Epub 2005 Jun 10.
- Coimbra S, Costa M, Mendes MA, Pereira AM, Pinto J, Pereira LG (2010). Early germination of Arabidopsis pollen in a double null mutant for the arabinogalactan protein genes AGP6 and AGP11. *Sex Plant Reprod*. 2010 Sep;23(3):199-205. doi: 10.1007/s00497-010-0136-x.
- Curtis, M.D., & Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133, 462-469.
- Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C.L., and Rowan, E.G. (1997). On the convergent evolution of animal toxins conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4302-4309.
- Dick-Perez M, Zhang Y, Hayes J, Salazar A, Zabolina OA, & Hong M. (2011) Structure and Interactions of Plant Cell-Wall Polysaccharides by Two- and Three-Dimensional Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. *Biochemistry*, 2011, 50 (6), pp 989–1000. doi: 10.1021/bi101795q.
- Di Cola A, Frigerio L, Lord JM, Roberts LM, Ceriotti A (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation of ricin A chain has unique and plant-specific features. *Plant Physiol*. 137, 287–296. doi:10.1104/pp.104.055434
- Dilokpimol A, Poulsen CP, Vereb G, Kaneko S, Schulz A, Geshi (2014). N-Galactosyltransferases from Arabidopsis thaliana in the biosynthesis of type II arabinogalactan: molecular interaction enhances enzyme activity. *BMC Plant Biology*. April 2014 DOI: 10.1186/1471-2229-14-90.
- Ding L & Zhu JK (1997) A role of arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* 203:289–294.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poething S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of Arabidopsis thaliana root. *Development* 119:71–84
- Domozych DS, Ciancia M, Fangel JU, Mikkelsen JD, Ulvskov P, Willats WGT. (2012). The cell walls of green algae: a journey through evolution. *Frontiers in Plant Science* 3: 82. doi: 10.3389/fpls.2012.00082.

- Du, H., Clarke, A. E., & Bacic, A. (1996) *Trends Cell Biol.* 6, 411–414
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A (2010). Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface. *Plant Physiology* 153: 403–419. doi: 10.1104/pp.110.156000.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzger E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001 Oct 5; 107(1):43-54.
- Estevez JM, Leonardi PI, Alberghina JS (2008). Cell Wall Carbohydrate Epitopes In The Green Alga *Oedogonium Bharuchae* F. Minor (Oedogoniales, Chlorophyta)(1). *J Phycol.* 2008 Oct;44(5):1257-68. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00568.x
- Estevez JM, Fernández PV, Kasulin L, Dupree P, Ciancia M (2009). Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology*. 2009 Mar;19(3):212-28. doi: 10.1093/glycob/cwn101
- Fincher GB, Stone BA, Clarke AE (1983) Arabinogalactan proteins: structure, biosynthesis & function. *Annu Rev Plant Physiol* 34:47–70.
- Galway ME, Masucci JD, Lloyd AM, Walbot V, Davis RW, Schiefelbein JW, (1994). The TTG gene is required to specify epidermal cell fate & cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Devel Biol* 166:740–754.
- Gaspar, Y. M., Johnson, K. L., McKenna, J. A., Bacic A & Schultz CJ (2001) *Plant Mol. Biol.* 47, 161–176
- Ge X, Chang F, Ma H (2010) Signaling and transcriptional control of reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 20(22):R988–R997.
- Gens, J. S., Fujiki, M., & Pickard, B. G. (2000) *Protoplasma* 212, 115–134
- Gille S, Sharma V, Baidoo E, Keasling JD, Scheller HV & Pauly M (2013). Arabinosylation of a Yariv-Precipitable Cell Wall Polymer Impacts Plant Growth as Exemplified by the *Arabidopsis* Glycosyltransferase Mutant *ray1*. *Molecular Plant*, Volume 6, Number 4, Pages 1369–1372 July 2013.
- Hartwig T & Zhi-Yong Wang. (2015) The molecular circuit of steroid signalling in plants. *Essays In Biochemistry* Sep 15, 2015, 58 71-82; DOI: 10.1042/bse0580071
- He, J.-X., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J., & Wang, Z.-Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 10185–10190. <http://doi.org/10.1073/pnas.152342599>
- Herve C, Simeon A, Jam M, Cassin A, Johnson KL, Salmean AA, Willats WGT, Doblin MS, Bacic A, Kloareg B (2016). Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development. *New Phytologist* 209: 1428–1441.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., and Fraaije, J.G.E.M. (1997). LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry* 18, 1463-1472.

- Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation* 4, 435-447.
- Hieta, R., & Myllyharju, J (2002). *J. Biol. Chem.* 277, 23965–23971.
- Hijazi, M., Velasquez, S. M., Jamet, E., Estevez, J. M., & Albenne, C. (2014). An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Frontiers in Plant Science*, 5, 395. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00395>
- Huang Y, Wang Y, Tan L, Sun L, Petrosino J, Cui MZ, Hao F, & Mingjun Zhang (2016). Nanospherical arabinogalactan proteins are a key component of the high-strength adhesive secreted by English ivy. May 23, 2016, doi: 10.1073/pnas.1600406113 PNAS June 7, 2016 vol. 113 no. 23 E3193-E3202.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001 Apr 20;292(5516):464-8. Epub 2001 Apr 5. DOI: 10.1126/science.1059817
- Jackson O, Taylor O, Adams DG, Knox JP (2012). Arabinogalactan proteins occur in the free-living cyanobacterium genus *Nostoc* in plant–*Nostoc* symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1338–1349.
- Jauh GY & Lord EM (1996) Localization of pectins & arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube & style, & their possible roles in pollination. *Planta* 199:251–261.
- Johnson KL(a), Jones BJ, Bacic A & Schultz CJ (2003) *Plant Physiol.* 133, 1911–1925
- Johnson KL(b), Jones BJ, Schultz CJ & Bacic A (2003) in *The Plant Cell Wall* (Rose, J., ed) pp. 111–154, Blackwell Publishing, Oxford, UK
- Kang, Y. H., Song, S.-K., Schiefelbein, J., & Lee, M. M. (2013). Nuclear Trapping Controls the Position-Dependent Localization of CAPRICE in the Root Epidermis of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 163(1), 193–204. <http://doi.org/10.1104/pp.113.221028>
- Kafri R, Springer M, Pilpel Y (2009). Genetic redundancy: new tricks for old genes. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):389-92. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.027.
- Kerr EM & Fry SC (2003). Pre-formed xyloglucans and xylans increase in molecular weight in three distinct compartments of a maize cell-suspension culture. *Planta*. 2003 Jun; 217(2): 327–339. doi: 10.1007/s00425-003-1027-2
- Kieliszewski MJ & Lamport DT (1994) *Plant J.* 5, 157–172
- Kim, D. W., Lee, S. H., Choi, S.-B., Won, S.-K., Heo, Y.-K., Cho, M., ... Cho, H.-T. (2006). Functional Conservation of a Root Hair Cell-Specific cis-Element in Angiosperms with Different Root Hair Distribution Patterns. *The Plant Cell*, 18(11), 2958–2970. <http://doi.org/10.1105/tpc.106.045229>
- Kim, T.-W., Michniewicz, M., Bergmann, D. C., & Wang, Z.-Y. (2012). Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature*, 482(7385), 419–422. <http://doi.org/10.1038/nature10794>

- Kirik V1, Simon M, Huelskamp M, Schiefelbein J. (2004) The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis. *Dev Biol.* 2004 Apr 15;268(2):506-13.
- Knox JP. (2016) *New Phytologist* 209: 1341–1343
- Koshino-Kimura Y1, Wada T, Tachibana T, Tsugeki R, Ishiguro S, Okada K. (2005) Regulation of CAPRICE transcription by MYB proteins for root epidermis differentiation in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2005 Jun;46(6):817-26. Epub 2005 Mar 28.
- Kuppusamy K. T., Chen, A. Y., & Nemhauser, J. L. (2009). Steroids are required for epidermal cell fate establishment in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 8073–8076. <http://doi.org/10.1073/pnas.0811633106>
- Kurata T1, Ishida T, Kawabata-Awai C, Noguchi M, Hattori S, Sano R, Nagasaka R, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Kato T, Sato S, Tabata S, Okada K, Wada T. (2005) Cell-to-cell movement of the CAPRICE protein in Arabidopsis root epidermal cell differentiation. *Development.* 2005 Dec;132(24):5387-98. Epub 2005 Nov 16.
- Kwak SH & Schiefelbein J. (2008) A feedback mechanism controlling SCRAMBLED receptor accumulation and cell-type pattern in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2008 Dec 23;18(24):1949-54. doi: 10.1016/j.cub.2008.10.064.
- Kwak SH & Schiefelbein J. (2014) TRIPTYCHON, not CAPRICE, participates in feedback regulation of SCM expression in the Arabidopsis root epidermis. *Plant Signal Behav.* 2014;9(11):e973815. doi: 10.4161/15592324.2014.973815.
- Lamport DTA, Varnai P, Seal CE. (2014). Back to the future with the AGP-Ca²⁺ flux capacitor. *Annals of Botany* 114: 1069–1085.
- Lane DR, Wiedemeier A, Peng LC (2001) Temperature sensitive alleles of RSW2 link the KORRIGAN endo-1,4-β-glucanase to cellulose synthesis & cytokinesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126:278–288
- Lederkremer GZ (2009). Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 515–523 10.1016/j.sbi.2009.06.004
- Lee MM, Schiefelbein J. (1999) WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell.* 1999 Nov 24;99(5):473-83.
- Lee, M. M., & Schiefelbein, J. (2002). Cell Pattern in the Arabidopsis Root Epidermis Determined by Lateral Inhibition with Feedback. *The Plant Cell*, 14(3), 611–618. <http://doi.org/10.1105/tpc.010434>
- Li J & Chory J. (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell.* 1997 Sep 5;90(5):929-38.
- Li J & Nam KH. (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science.* 2002 Feb 15;295(5558):1299-301.
- Liebming E., Veit C., Mach L., Strasser R. (2010). Mannose trimming reactions in the early stages of the N-glycan processing pathway. *Plant Signal. Behav.* 5, 476–478 10.4161/psb.5.4.11423.

- Liu JX, Howell SH (2010). Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* 22, 2930–2942. doi:10.1105/tpc.110.076349.
- Ma H, Zhao J. (2010) *Journal of Experimental Botany* 2010; 61:2647-2668
- Majamaa, K., Gunzler, V., Hanauske-Abel, H.M., Myllyla, R., and Kivirikko, K.I. (1986). Partial identity of the 2-oxoglutarate and ascorbate binding sites of prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 261, 7819-7823.
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol* 122: 3-10
- Mangano S, Denita-Juarez SP, Choi HS, Marzol E, Hwang Y, Ranocha P, Velasquez SM, Borassi C, Barberini ML, Aptekmann, Muschietti JP, Nadra AD, Dunand C, Cho HT, Estevez JM (2017). Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(20):5289-5294. doi: 10.1073/pnas.1701536114.
- Martinière, A., Lavagi, I., Nageswaran, G., Rolfe, D. J., Maneta-Peyret, L., Luu, D.-T., ... Runions, J. (2012). Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12805–12810. <http://doi.org/10.1073/pnas.1202040109>
- Marzec, M., Szarejko, I., & Melzer, M. (2015). Arabinogalactan proteins are involved in root hair development in barley. *Journal of Experimental Botany*, 66(5), 1245–1257. <http://doi.org/10.1093/jxb/eru475>
- Masucci JD, Schiefelbein JW (1994) The rhd6 mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root hair initiation through an auxin associatedðylene-associated process. *Plant Physiol* 106:1335–1346.
- Matsuoka, K. (2003) Protein modification in the Golgi apparatus. In *The Golgi Apparatus and the Plant Secretory Pathway: Annual Plant Reviews, Vol 9* (Robinson, D.G., ed). Oxford: Blackwell, pp. 102-113 (2003).
- McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox JP. (2003) Cell wall pectic (1-->4)-beta-d-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J*. 2003 Feb;33(3):447-54.
- Melzer B, Steinbrecher T, Seidel R, Kraft O, Schwaiger R, Speck T (2010). The attachment strategy of English ivy: a complex mechanism acting on several hierarchical levels. *J R Soc Interface*. 2010 Sep 6;7(50):1383-9. doi: 10.1098/rsif.2010.0140. Epub 2010 May 12.
- Menand B, Yi K, Jouannic S, Hoffmann L, Ryan E, Linstead P, Schaefer DG, Dolan L. (2007) An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science*. 2007 Jun 8;316(5830):1477-80
- Mizukami AG, Inatsugi R, Jiao J, Kotake T, Kuwata K, Ootani K, Okuda S, Sankaranarayanan S, Sato Y, Maruyama D, Iwai H, Garenaux E, Sato C, Kitajima K, Tsumuraya Y, Mori H, Yamaguchi J, Itami K, Sasaki N, and Higashiyama T (2016). The AMOR Arabinogalactan Sugar Chain Induces Pollen-Tube Competency to Respond to Ovular Guidance, *Current Biology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.040>

- Monshausen GB, Messerli MA, Gilroy S (2008) Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca²⁺ follow oscillating increases in growth in root hairs of Arabidopsis. *Plant Physiol* 147: 1690-1698. [10.1104/pp.108.123638](https://doi.org/10.1104/pp.108.123638)
- Nam KH, Li J. (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*. 2002 Jul 26;110(2):203-12.
- Nemhauser, J. L., Mockler, T. C., & Chory, J. (2004). Interdependency of Brassinosteroid and Auxin Signaling in Arabidopsis . *PLoS Biology*, 2(9), e258. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020258>
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J. (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*. 2006 Aug 11;126(3): 467-75.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenfuhr, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* 51, 1126-1136.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Yuan, H., ... Tax, F. E. (1999). Brassinosteroid-Insensitive Dwarf Mutants of Arabidopsis Accumulate Brassinosteroids. *Plant Physiology*, 121(3), 743–752.
- Nguema-Ona E, Bannigan A, Chevalier L, Baskin T & Driouich A. (2007) Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of Arabidopsis thaliana *The Plant Journal* (2007) doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03224.x
- Ogawa-Ohnishi M & Matsubayashi Y (2015). Identification of three potent hydroxyproline O-galactosyltransferases in Arabidopsis. *Plant J*. 2015 Mar;81(5):736-46. doi: 10.1111/tbj.12764.
- Park, E., & Nebenfuhr, A. (2013). Myosin XIX of Arabidopsis thaliana Accumulates at the Root Hair Tip and Is Required for Fast Root Hair Growth. *PLoS ONE*, 8(10), e76745. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076745>
- Park MH, Suzuki Y, Chono M, Knox JP and Yamaguchi I (2003). CsAGP1, a Gibberellin-Responsive Gene from Cucumber Hypocotyls, Encodes a Classical Arabinogalactan Protein and Is Involved in Stem Elongation. *Plant Physiology*, March 2003, Vol. 131, pp. 1450–1459.
- Payne, C. T., Zhang, F., & Lloyd, A. M. (2000). GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics*, 156(3), 1349–1362.
- Peng LC, Hocart CH, Redmond JW, Williamson RE (2000) Fractionation of carbohydrates in Arabidopsis root cell walls shows that three radial swelling loci are specifically involved in cellulose production. *Planta* 211:406–414 957.
- Pereira A.M., Nobre M.S., Pinto S.C., Lopes A.L., Costa M.L., Masiero S., and Coimbra S. (2016). “Love is strong, and you’re so sweet”#: JAGGER is essential for persistent synergid degeneration and polytubey block in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2016.01.002.

- Pickard BG & Fujiki M (2005). Ca²⁺ pulsation in BY-2 cells and evidence for control of mechanosensory Ca²⁺ selective channels by the plasmalemmal reticulum. *Functional Plant Biology*. 2005;32:863–879.
- Roberts, K. (2001). How the Cell Wall Acquired a Cellular Context. *Plant Physiology*, 125(1), 127–130.
- Roy SJ, Holdaway-Clarke TL, Hackett GR, Kunkel JG, Lord EM, Hepler PK (1999). Uncoupling secretion and tip growth in lily pollen tubes: evidence for the role of calcium in exocytosis. *Plant J*. 1999 Aug;19(4):379-86.
- Ryu KH1, Kang YH, Park YH, Hwang I, Schiefelbein J, Lee MM. (2005) The WEREWOLF MYB protein directly regulates CAPRICE transcription during cell fate specification in the Arabidopsis root epidermis. *Development*. 2005 Nov;132(21):4765-75. Epub 2005 Oct 5.
- Sala C, Sala F. (1985) Effect of brassinosteroid on cell division and enlargement in cultured carrot (*Daucus carota* L.) cells. *Plant Cell Rep*. 1985 May;4(3):144-7. doi: 10.1007/BF00571302.
- Sardar, H. S., Yang, J., & Showalter, A. M. (2006). Molecular Interactions of Arabinogalactan Proteins with Cortical Microtubules and F-Actin in Bright Yellow-2 Tobacco Cultured Cells. *Plant Physiology*, 142(4), 1469–1479. <http://doi.org/10.1104/pp.106.088716>
- Schiefelbein JW, Somerville C (1990) Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2:235–243.
- Schiefelbein JW, Masucci JD, Wang H (1997) Building a root: the control of patterning&morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9:1089–1098.
- Schiefelbein J, Zheng X and Huang L (2014) Regulation of epidermal cell fate in *Arabidopsis* roots: the importance of multiple feedback loops. *Front. Plant Sci.* 5:47. doi:10.3389/fpls.2014.00047
- Seifert GJ, Barber C, Wells B, Dolan L, Roberts K. (2002) Galactose biosynthesis in *Arabidopsis*: genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-galactose into cell wall polymers. *Curr Biol*. 2002 Oct 29;12(21):1840-5.
- Seifert G, Roberts K. (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58: 137–161.
- Serpe MD & Nothnagel EA (1994) Effets of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193:542–550.
- Schiefelbein, J. W. (2000). Constructing a Plant Cell. The Genetic Control of Root Hair Development. *Plant Physiology*, 124(4), 1525–1531.
- Schiefelbein, J., Huang, L., & Zheng, X. (2014). Regulation of epidermal cell fate in *Arabidopsis* roots: the importance of multiple feedback loops. *Frontiers in Plant Science*, 5, 47. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00047>
- Schultz, C. J., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J. J.,&Bacic, A. (1998) *Trends Plant Sci.* 3, 426–431
- Schultz, C. J., Johnson, K., Currie, G.,&Bacic, A. (2000) *Plant Cell* 12, 1–18
- Schultz, C. J., Rumsewicz, M. P., Johnson, K. L., Jones, B. J., Gaspar, Y. M.&Bacic, A. (2002) *Plant Physiol.* 129, 1448–1463

- Schultz CJ, Ferguson KL, Lahnstein J, Bacic A (2004). Post-translational modifications of arabinogalactan-peptides of *Arabidopsis thaliana*. Endoplasmic reticulum and glycosylphosphatidylinositol-anchor signal cleavage sites and hydroxylation of proline. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45503-11. Epub 2004 Aug 18.
- Shimizu, M., Igasaki, T., Yamada, M., Yuasa, K., Hasegawa, J., Kato, J., Tsukagoshi, H., Nakamura, K., Fukuda, H. and Matsuoka, K. (2005) Experimental determination of proline hydroxylation and hydroxyproline arabinogalactosylation motifs in secretory proteins. *Plant J.*, 42, 877-889.
- Showalter AM (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression&function. *Cellular Molecular Life Sciences* 58: 1399–1417.
- Showalter AM & Basu D (2016). *Communicative & Integrative Biology*, 2016, Vol. 0, No. 0, E1177687.
- Simon M1, Lee MM, Lin Y, Gish L, Schiefelbein J. (2007) Distinct and overlapping roles of single-repeat MYB genes in root epidermal patterning. *Dev Biol.* 2007 Nov 15;311(2):566-78. Epub 2007 Sep 14.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206-2211
- Sørensen, I., Domozych, D., & Willats, W. G. T. (2010). How Have Plant Cell Walls Evolved? *Plant Physiology*, 153(2), 366–372. <http://doi.org/10.1104/pp.110.154427>
- Sun W, Kieliszewski MJ, Showalter AM (2004) Overexpression of tomato LeAGP1 arabinogalactan protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant J* 40: 870–881.
- Sun, W. X., Zhao, Z. D., Hare, M. C., Kieliszewski, M. J., & Showalter, A. M. (2004) *Physiol. Plant.* 120, 319–327.
- Szekeres M1, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C. (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell.* 1996 Apr 19;85(2):171-82.
- Tan L, Qiu F, Lamport D & Kieliszewski M (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 13156–13165
- Tan L, Showalter AM, Egelund J, Hernandez-Sanchez A, Doblin MS, & Bacic A (2012). Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Frontiers in Plant Science*, 3, 140. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00140>
- Tiainen P, Myllyharju J, Koivunen P (2005). Characterization of a second *Arabidopsis thaliana* prolyl 4-hydroxylase with distinct substrate specificity. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2): 1142-8.
- Tironi IG, René Sperb R, Smith PE, van Gunsteren WF (1995) A Generalized reaction field method for molecular-dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics* 102(13):5451-5459. DOI: 10.1063/1.469273

- Ulvskov P, Paiva DS, Domozych D, Harholt J (2013). Classification, naming & evolutionary history of glycosyltransferases from sequenced green & red algal genomes. *PLoS ONE* 8: e76511.
- Vaughn KC, Bowling AJ (2011) Biology and physiology of vines. *Hortic Rev* 38:1–21.
- Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernandez PV, Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, Verli H, Pauly M, Bacic A, Olsen CE, Ulvskov P, Petersen BL, Somerville C, Iusem ND, Estevez JM (2011). O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science*. 2011 Jun 17;332(6036):1401-3. doi: 10.1126/science.1206657.
- Velasquez SM, Ricardi MM, Poulsen CP, Oikawa A, Dilokpimol A, Halim A, Mangano S, Denita Juarez SP, Marzol E, Salgado Salter JD, Dorosz JG, Borassi C, Möller SR, Buono R, Ohsawa Y, Matsuoka K, Otegui MS, Scheller HV, Geshi N, Petersen BL, Iusem ND, Estevez JM. (2015) Complex regulation of prolyl-4-hydroxylases impacts root hair expansion. *Mol Plant*. 2015 May;8(5):734-46. doi: 10.1016/j.molp.2014.11.017.
- Verbelen, J.-P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., & Baluška, F. (2006). The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), 296–304.
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J. (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:177-201.
- Vert G & Chory J. (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature*. 2006 May 4;441(7089):96-100.
- Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AG, Visser RG (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* 132: 1781-1789
- Wada T, Kurata T, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Tachibana T, Goto K, Marks D, Shimura Y and Okada K. (2002) Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 129, 5409-5419 5409 © 2002 The Company of Biologists Ltd doi:10.1242/dev.00111.
- Walker, A. R., Davison, P. A., Bolognesi-Winfield, A. C., James, C. M., Srinivasan, N., Blundell, T. L., ... Gray, J. C. (1999). The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*, 11(7), 1337–1350.
- Wang X (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 408–414
- Wang, X. (2005). Regulatory Functions of Phospholipase D and Phosphatidic Acid in Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Plant Physiology*, 139(2), 566–573. <http://doi.org/10.1104/pp.105.068809>
- Wang Z-Y, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T & Chory J (2002). Nuclear-Localized BZR1 Mediates Brassinosteroid-Induced Growth and Feedback Suppression of Brassinosteroid Biosynthesis. *Developmental Cell*, Vol. 2, 505–513, 2002 by Cell Press. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00153-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00153-3)

- Weigel, D., and Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Weigel D, Glazebrook J. (2006) Root transformation of *Arabidopsis*. *CSH Protoc.* 2006 Dec 1;2006(7). pii: pdb.prot4671. doi: 10.1101/pdb.prot4671.
- Willats WGT & Knox JP (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of b-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 9:919–925.
- Wilson IB (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 569–577.
- Wydro, M., Kozubek, E., and Lehmann, P. (2006). Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*- 53, 289.
- Xu Q, Buckley D, Guan C, Guo H-C (1999) Structural insights into the mechanism of intramolecular proteolysis. *Cell* 98: 651–661.
- Yamada, H. Nothnagel, E. A., & Clarke, A. E. (2000). *Cell & Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins*. pp. 221–229, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Yan Z., Zhao, J., Peng, P., Chihara, R. K., & Li, J. (2009). BIN2 Functions Redundantly with Other *Arabidopsis* GSK3-Like Kinases to Regulate Brassinosteroid Signaling. *Plant Physiology*, 150(2), 710–721. <http://doi.org/10.1104/pp.109.138099>
- Yariv J, Lis H, Katchalski E. (1967) Precipitation of arabic acid & some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* 105: 1C–2C.
- Yi K, Menand B, Bell E & Dolan L. (2010) A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nature Genetics* 42, 264–267 (2010) doi:10.1038/ng.529.
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J. (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*. 2002 Apr 19;109(2):181-91.
- Yu Sun, Xi-Ying Fan, Dong-Mei Cao, Wenqiang Tang, Kun He, Jia-Ying Zhu, Jun-Xian He, Ming-Yi Bai, Shengwei Zhu, Eunkyoo Oh, Sunita Patil, Tae-Wuk Kim, Hongkai Ji, Wing Hong Wong, Seung Y. Rhee, and Zhi-Yong Wang (2010). Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in *Arabidopsis* *Developmental Cell* 19, 765–777, November 16, 2010 a2010 Elsevier Inc.
- Zavaliev, R., Dong, X., & Epel, B. L. (2016). Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Modification Serves as a Primary Plasmodesmal Sorting Signal. *Plant Physiology*, 172(2), 1061–1073. <http://doi.org/10.1104/pp.16.01026>
- Zhao ZD, Tan L, Showalter, AM, Lamport DTA & Kieliszewski MJ (2002) *Plant J.* 31, 431–444.
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT, Lloyd A. (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*. 2003 Oct; 130(20):4859-69. Epub 2003 Aug 13.