



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**DISECCIÓN GENÉTICA DEL TRANSPORTE DE PROTEÍNAS A
VACUOLAS**

TESIS DOCTORAL

Ma. Otilia Delgadillo López

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**DISECCIÓN GENÉTICA DEL TRANSPORTE DE PROTEÍNAS A
VACUOLAS**

TESIS DOCTORAL

Ma. Otilia Delgadillo López

DIRECTORES

Enrique Rojo de la Viesca y Michael Sauer

Madrid, 2015



DISECCIÓN GENÉTICA DEL TRANSPORTE DE PROTEÍNAS A VACUOLAS

Memoria presentada para optar al grado de

Doctor en Ciencias por:

Ma. Otilia Delgadillo

Universidad Autónoma de Madrid

Diciembre 2015

Vº Bº del Director de Tesis: Vº Bº del Director de Tesis:

Dr. Enrique Rojo de la Viesca

Dr. Michael Sauer

Vº Bº del Tutor de Tesis:

Dr. Luis Enjuanes

GRACIAS

A todas las personas que han colaborado en el desarrollo de este trabajo
especialmente a :

Mis directores de Tesis

Dr. Enrique Rojo

Dr. Michael Sauer

Por todo su esfuerzo y dedicación

GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC.

El deseo de luz produce luz.

Hay verdadero deseo cuando hay esfuerzo de atención.

Es realmente la luz lo que se desea cuando cualquier otro móvil está ausente.

Aunque los esfuerzos de atención fuesen durante años aparentemente estériles,

un día, una luz exactamente proporcional a esos esfuerzos inundará el alma.

Cada esfuerzo añade un poco más de oro a un tesoro que nada en el mundo puede sustraer.

Simone Weil.

Dedicada a mis padres y hermanos...

ABREVIATURAS

AG	Aparato de Golgi
Arf	Factor de ribosilación del ADP
Arf-GAP	Proteína activadora de la Arf-GTPasa
Arf-GEF	Factor intercambiador de nucleótido de guanina en las Arf
BFA	Brefeldina A
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequences</i>
CCV	vesícula recibida de clatrina
Col-0	Columbia-0
DV	Vesícula densa
EMS	Metanosulfonato de etilo
ERES	Sitios de salida del RE
GFP	Proteína fluorescente verde procedente de <i>Aequorea victoria</i>
mtv	<i>modificados en el transporte a vacuola</i>
PAC	vesícula acumuladora de precursores
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PI3P	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PVC	Compartimento Prevacuolar
RE	Retículo endoplásmico
RFP	Proteína fluorescente roja
RT	Transcriptasa reversa
SSLP	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
T-DNA	Inserción de DNA
TGN	Red del <i>trans</i> -Golgi
VR	Vacuola de reserva
VSR	Receptor de señales de direccionamiento vacuolar
VSS	<i>Vacuolar sorting signal</i>

Wm

Wortmanina

ÍNDICE

ÍNDICE

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Organización del sistema de endomembranas	7
2. Esquema general del tráfico de proteínas solubles en eucariotas	7
3. Factores implicados en el tráfico intracelular	9
Proteínas ARF y sus efectores	10
Receptores de cargo	10
Cubiertas de vesículas	11
a) Vesículas COPII	11
b) Vesículas COPI	11
c) CCVs	11
d) Retrómero	11
Epsinas	11
SNAREs y proteínas SM	12
Enzimas modificadoras de fosfoinosítidos	12
4. La vacuola en plantas: vacuolas líticas y vacuolas de reserva	13
5. Rutas de tráfico de proteínas a vacuolas en plantas	14
6. Señales de direccionamiento a vacuolas de proteínas solubles de plantas	16
Señales secuencia específica (ssVSS)	16
Señales C-terminales (ctVSS)	16
Señales estructurales (VRSS)	17
7. Receptores de señales de direccionamiento a vacuolas	17
Familia de receptores VSR	18
La familia de receptores RMR	19
8. Identificación de factores implicados en el transporte a vacuola en plantas	20
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Vectores de clonación y transformación	29
2. Anticuerpos	29
3. Cepas bacterianas	29
4. Material vegetal	30
5. Cultivo de bacterias	30
6. Cultivo <i>in vitro</i> de Arabidopsis	30
7. Cultivo de plantas en tierra	31
8. Transformación de <i>A. thaliana</i>	31
9. Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	31
10. Cartografía génica	31
11. Genotipado de líneas mutantes de inserción de T-DNA	32
12. Electroforesis y purificación de fragmentos en geles de agarosa	33
13. Clonaje de construcciones	33
14. Sistema Gateway de Clonación	34
15. Obtención de ARN	35
16. Hibridación tipo northern	36
17. Transcripción reversa (RT)	36
18. Análisis de proteínas	36
19. Expresión y purificación de proteína de bacteria	37
20. Experimentos "Pull-Down"	37
21. Purificación en tándem de complejos proteínicos, "TAP-tagging"	38
22. Ensayo Lipid-strip	38

23. Tinción histoquímica: Detección de actividad β -glucuronidasa (GUS)	38
24. Ensayos de autofagia	38
25. Microscopía confocal	39
26. Tratamientos	39
27. Aplicaciones bioinformáticas	39
RESULTADOS	41
1. Búsqueda de mutantes <i>modificados en el transporte a vacuolas (mtv)</i>	43
2. Cartografiado posicional de las mutaciones <i>mtv1-1</i> , <i>mtv3-1</i> y <i>mtv4-1</i>	44
3. <i>MTV1</i> y <i>MTV4</i> interaccionan genéticamente en el desarrollo de la planta	46
4. <i>MTV1</i> y <i>MTV4</i> codifican para proteínas con dominios ENTH y ArfGAP, respectivamente	47
5. <i>MTV1</i> y <i>MTV4/AGD5</i> presentan patrones de expresión semejantes	49
6. <i>MTV1</i> y <i>AGD5</i> están implicados específicamente en el transporte del cargo vacuolar	51
7. <i>MTV1</i> y <i>AGD5</i> colocalizan en el TGN y redistribuyen en el borde de los cuerpos de BFA	56
8. <i>MTV1</i> , <i>AGD5</i> y clatrina colocalizan en un dominio especial del TGN	60
9. <i>MTV1</i> y <i>AGD5</i> actúan en el tráfico dependiente de clatrina desde el TGN	62
10. <i>MTV1</i> y <i>AGD5</i> interactúan directamente con clatrina	65
11. La pérdida de función de <i>MTV3/PTEN2a</i> y de su parólogo <i>PTEN2b</i> provoca la secreción de <i>VAC2</i>	67
12. El alelo <i>mtv3-1</i> es de pérdida de función e interfiere con la proteína <i>MTV3</i> silvestre	68
13. Patrón de expresión de <i>MTV3</i>	69
14. Ensayo de unión la unión de <i>MTV3</i> a fosfoinosítidos	70
15. <i>MTV3</i> se localiza en el citoplasma y en el TGN	70
16. La sobre-expresión de <i>MTV3</i> fusionado a GFP causa la secreción de <i>VAC2</i>	74
17. <i>MTV3</i> está implicado en el transporte de proteínas vacuolares endógenas	76
18. La sobreexpresión de <i>MTV3-GFP</i> causa la deslocalización de <i>VTI12</i>	77
19. La sobreexpresión de RFP- <i>MTV3</i> afecta la localización del marcador de PI(3)3	79
20. La sobreexpresión de RFP- <i>MTV3</i> acelera la senescencia por autofagia	80
DISCUSIÓN	83
El rastreo de mutantes <i>mtv</i> es eficiente para identificar la maquinaria de tráfico vacuolar	85
Las vesículas recubiertas de clatrina median transporte de proteínas entre el TGN y el PVC	87
La homeostasis de fosfoinosítidos es fundamental para el transporte eficiente a vacuolas	90
Rutas de tráfico en las plantas	92
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de formación y fusión de tráfico de vesículas	10
Figura 2. Tráfico de proteínas a través de la ruta biosintética hacia la vacuola	15
Figura 3. Identificación de los mutantes <i>mtv1</i> , <i>mtv3</i> y <i>mtv4</i> .	44
Figura 4. Caracterización del fenotipo de plantas mutantes <i>mtv1</i> , <i>agd5</i> y <i>agd5 mtv1</i>	47
Figura 5. Los mutantes de inserción de DNA-T y los alelos EMS de <i>mtv1</i> y <i>mtv4</i> representan fenotipos equivalentes	48
Figura 6. Análisis filogenético de MTV1	49
Figura 7. Análisis del patrón de expresión de los genes AGD5 y MTV1	50
Figura 8. MTV1 y AGD5 están implicados en el transporte de proteínas vacuolares de reserva en semillas.	52
Figura 9. MTV1 y AGD5 están implicados en transporte de proteínas vacuolares endógenas en tejidos vegetativos.	53
Figura 10. MTV1 y AGD5 no están implicados en endocitosis y en la ruta secretora	54
Figura 11. MTV1 y AGD5 no están implicados en el transporte de auxinas	55
Figura 12. MTV1 y AGD5 no se localizan en Golgi o en el PVC	57
Figura 13. MTV1 se localiza en un compartimento asociado a Golgi	58
Figura 14. MTV1 y AGD5 se localizan en el TGN	59
Figura 15. Las proteínas MTV1 y AGD5 se distribuyen en la periferia de los cuerpos de BFA	61
Figura 16. MTV1 y AGD5 colocalizan con clatrina	62
Figura 17. MTV1 y AGD5 están asociadas a las vesículas CCVs	63
Figura 18. Alteraciones en el tráfico intracelular en el mutante <i>mtv1 agd5</i>	64
Figura 19. MTV1 y AGD5 se unen directamente a clatrina	66
Figura 20. MTV3 y su parálogo PTEN2B están implicados en el tráfico de proteínas a vacuolas	67
Figura 21. Patrón de expresión del gen MTV3 durante el desarrollo de la planta	69
Figura 22. Perfil de unión de MTV3 a fosfolípidos	70
Figura 23. Localización de MTV3-GFP y <i>mtv3-1</i> -GFP en protoplastos de Arabidopsis	71
Figura 24. MTV3 se localiza en citoplasma y TGN	72
Figura 25. La mutación <i>mtv3-1</i> afecta la localización de la proteína	73
Figura 26. Distribución de MTV3 y <i>mtv3-1</i> en gradientes de sacarosa	74
Figura 27. La sobreexpresión de MTV3GFP y MTV3-1-GFP afecta el tráfico de proteínas endógenas a la vacuola	75
Figura 28. La sobreexpresión de MTV3-GFP y <i>mtv3-1</i> GFP afecta la autofluorescencia de las vacuolas de reserva de semillas TGN	76
Figura 29. La expresión de MTV3-GFP afecta la localización subcelular de VTI12.	77
Figura 30. Los agregados de VTI12 en el interior del lumen de la vacuola de las plantas proMTV3::MTV3-GFP son móviles.	78
Figura 31. VTI12 y MTV3 colocalizan parcialmente en compartimentos resistentes al BFA	78
Figura 32. La sobreexpresión de RFP-MTV3 afecta la distribución de PI3P y la morfología del PVC	79
Figura 33. El tratamiento con wortmanina provoca el mismo efecto que la sobreexpresión de RFP-MTV3 sobre la localización de YFP2xFYVE.	80
Figura 34. Ensayo de autofagia en plantas que sobreexpresan MTV3.	81
Figura 35. Análisis filogenético de MTV1 y las proteínas con dominio ENTH Epsin1, Epsin2 y Epsin 3 en plantas.	89
Figura 36. Modelo de la función de MTV1, MTV3 y MTV4 en el transporte a vacuolas	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipo de señales de direccionamiento vacuolar	17
Tabla 2. Factores identificados en tráfico de proteínas a vacuola de reserva	21
Tabla 3A. Marcadores tipo SSLP y tipo CAP diseñados para la identificación de MTV1 y MTV3, y cebadores empleados en la resolución de los mismos	32
Tabla 3B. Marcadores tipo SSLP y tipo CAP diseñados para la identificación de MTV4 y cebadores empleados en la resolución de los mismos	32
Tabla 4. Información de las diferentes líneas de inserción de DNA-T utilizadas y los cebadores usados para identificar las inserciones	33
Tabla 5. Construcciones realizadas para la obtención de plantas transgénicas y expresión en bacteria. Se indica la secuencia de origen del fragmento amplificado y el vector utilizado en cada caso	34
Tabla 6. Lista de cebadores utilizados en la amplificación de los fragmentos clonados por la tecnología Gateway	35

SUMMARY

Summary

Vacuoles have essential and specific roles in plants. However, our mechanistic knowledge of how trafficking to, and biogenesis of these organelles occurs in plants is very limited. To gain insight into these matters, we have undertaken a genetic approach to identify the cellular machinery involved in transporting proteins to the vacuole. Using a genetic screen for modified transport to the vacuole (*mtv*) mutants that secrete the chimeric vacuolar cargo VAC2, we have isolated and characterized three novel genes involved in vacuolar trafficking, *MTV1*, *MTV3* and *MTV4*.

MTV1 encodes for a protein with an Epsin N-terminal homology (ENTH) domain for binding to phosphoinositides (PIs) and several clathrin-binding motifs in the C-terminal part of the protein. *MTV4* encodes for the AGD5 protein that contains an Arf GTPase activating domain. *MTV1* and *MTV4* colocalize in a specific subdomain of the trans Golgi Network (TGN), together with clathrin. Moreover, both *MTV1* and *MTV4* interact directly with clathrin and are found in clathrin coated vesicles (CCVs). Combined mutations in *MTV1* and *MTV4* severely disrupt vacuolar trafficking and development. These trafficking defects are coupled to altered TGN morphology and defective distribution of vacuolar sorting receptors (VSRs) that transport vacuolar cargo from the TGN to the prevacuolar compartment (PVC) in CCVs. Altogether, our results support that *MTV4* and *MTV1* mediate formation of CCVs at the TGN for transport of VSRs and associated vacuolar cargo to the PVC.

MTV3 encodes the PTEN2a phosphatase that dephosphorylates the 3' position in phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), phosphatidylinositol 3,4 biphosphate and phosphatidylinositol 3,5 biphosphate, which are the PIs that specifically label organelles in the route to the vacuole. *MTV3* distributes between the cytosol and the TGN, and the *mtv3-1* mutation, which co-dominantly disrupts vacuolar trafficking, provokes a decrease in TGN association of the protein. We show that concurrent loss of function of *MTV3/PTEN2a* and its paralogue *PTEN2b* also results in abnormal secretion of VAC2 and of endogenous vacuolar proteins, indicating that these two phosphatases have a redundant function in transport of these cargoes. Moreover, overexpression of *MTV3* fused to GFP or RFP also causes alterations in trafficking and secretion of vacuolar cargo. The vacuolar trafficking defects in the over expressing plants can be ascribed to the missorting of proteins that are essential for transport in this route, such as the VSRs and the TGN localized SNARE VTI12. Moreover, we show that over expression of *MTV3* and of a PI3P binding protein (2X FYVE) results in PVC enlargement and altered distribution of PI3P, supporting that *MTV3*

regulates the allocation of PI species in membranes *in vivo*, and that this activity is essential for a correct functioning of the vacuolar trafficking pathway.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Organización del sistema de endomembranas

Las células eucariotas están organizadas en una red compleja de compartimentos u orgánulos, delimitados por membranas y denominados en conjunto sistema de endomembranas. Estos orgánulos se conectan entre sí mediante tráfico vesicular. Los orgánulos que forman el sistema de endomembranas son el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi (AG), la red del trans-Golgi (TGN), los endosomas, la vacuola y la membrana plasmática (MP) que delimita el espacio extracelular. Las mitocondrias y los cloroplastos no pertenecen al sistema de endomembranas (Frigerio and Hawes, 2008) aunque puedan en ciertos casos estar comunicados con éste mediante tráfico vesicular (Villarejo et al., 2005). La identidad morfológica y funcional de cada órgano está dada por la composición de proteínas y lípidos que forman su membrana limitante y por el tipo de proteínas solubles que contienen en su lumen, lo que permite a cada orgánulo realizar su función en las condiciones adecuadas y de manera aislada del medio que lo rodea, el citosol (Morita and Shimada, 2014).

El sistema de endomembranas comprende diversas rutas de tráfico entre compartimentos: 1) La ruta biosintética que dirige a las proteínas recién sintetizadas a través del sistema de endomembranas hacia la membrana plasmática y el espacio extracelular o hacia la vacuola, o bien a alguno de los compartimentos intermedios; 2) la endocitosis que toma las moléculas del exterior de la célula o de la MP para transportarlas a la vacuola donde son degradados o para su posterior retorno a la MP; 3) las rutas de reciclaje que permiten recuperar, entre otros, a la maquinaria que participa en el transporte del cargo por la ruta biosintética (Ebine and Ueda, 2009; Foresti and Denecke, 2008). Por convención el transporte en la ruta biosintética se considera en sentido anterógrado, mientras que el transporte en las rutas endocíticas y de reciclaje se considera que progresa en sentido retrógrado. El transporte de proteínas y lípidos entre los orgánulos se lleva a cabo bien por medio de pequeñas vesículas, bien por maduración de un orgánulo en otro, o bien por fusión heterotípica entre orgánulos (Paul and Frigerio, 2007).

2. Esquema general del tráfico de proteínas solubles en eucariotas

Si bien existen ciertas diferencias entre las rutas de tráfico para proteínas solubles de hongos,

INTRODUCCIÓN

animales y plantas, hay una serie de procesos generales que son comunes en todos los eucariotas. El RE representa la puerta de entrada al sistema de endomembranas para las proteínas solubles. Estas son co-traduccionalmente translocadas al lumen del RE, por medio del reconocimiento de una secuencia específica, llamada péptido señal, codificada en la estructura primaria de la proteína y que es eliminada durante el proceso de translocación (Zimmermann et al., 2011). Una vez en el lumen, las proteínas interactúan con las chaperonas residentes del RE que facilitan el plegamiento, y/o en su caso, el ensamblaje en complejos de proteínas. Las proteínas chaperonas conducen a las proteínas a través de un sofisticado mecanismo de control de calidad dependiente del RE (ERQC; *ER-mediated protein quality control*) que es capaz de detectar las proteínas que tienen un plegamiento defectuoso (Liu and Howell, 2010; Vitale and Ceriotti, 2004). En ese caso, el ERQC repara el error o, si no es posible la reparación, envía las proteínas defectuosas al citosol donde son eliminadas por medio de un proceso llamado degradación asociado al RE (ERAD: *ER-associated degradation*), que implica la ubiquitinación y la degradación por el proteosoma citosólico (Liu and Li, 2014). Las proteínas que seguirán la ruta biosintética salen del RE a través de los sitios específicos llamados ERES (*ER Exit Sites*), en dirección a la cara Cis del AG por medio de las vesículas COPII (Langhans et al., 2012). De forma converso, en la cara Cis del AG se forman las vesículas COPI para devolver proteínas residentes en el RE y componentes de la maquinaria necesaria para el transporte anterógrado desde el RE. El paso a través del AG se produce en la dirección anterógrada (*cis-trans*) por maduración de las cisternas y en dirección retrógrada (*trans-cis*) mediante vesículas que recuperan el cargo residente en las cisternas del AG (Donohoe et al., 2013). En el AG ocurre un proceso esencial de selección que separa las proteínas que deben ser dirigidas a vacuolas del resto de proteínas que por defecto serán secretadas al exterior de la célula (Denecke et al., 1990). La secreción es por tanto el destino de las proteínas introducidas en el sistema secretor que no posean señales de retención o direccionamiento a un orgánulo determinado. Se supone que la secreción se realiza mediante vesículas generadas en el TGN que se fusionan con la membrana plasmática y vierten su contenido al espacio extracelular. La selección de proteínas para su transporte a la vacuola precisa que las proteínas tengan identificadores específicos, denominados señales de direccionamiento a vacuolas, que son reconocidos por receptores encargados de dirigirlos hacia la vacuola (Neuhaus and Rogers, 1998). Las señales presentes en las proteínas vacuolares pueden ser secuencias de aminoácidos específicas, motivos estructurales o modificaciones post-traduccionales. En el extremo *trans* del AG las cisternas se disgregan formando la red del trans-Golgi ("Trans Golgi Network" TGN). Las proteínas vacuolares salen del TGN y se dirigen hacia la vacuola pasando

INTRODUCCIÓN

por el compartimento prevacuolar (PVC). Existen dos hipótesis principales sobre cómo ocurre el transporte entre el TGN y el PVC en plantas. Una aboga por que las proteínas abandonan el TGN en vesículas destinadas al compartimento prevacuolar (PVC), mientras que la otra propone que el PVC se forma por maduración del TGN y que por tanto las proteínas vacuolares no deben abandonar el TGN para alcanzar el PVC (Scheuring et al., 2011). En el PVC las proteínas de membrana que deban ser degradadas en la vacuola se internalizan en vesículas internas mediante el sistema ESCRT, formando un cuerpo multivesicular. El PVC termina fusionándose con la vacuola y las proteínas solubles y las vesículas internas se incorporan al lumen de la vacuola. Las vesículas con las proteínas de membrana que contienen son degradadas mediante lipasas y proteasas presentes en la vacuola (Otegui et al., 2006).

3. Factores implicados en tráfico intracelular

El trabajo pionero de los doctores Sheckman, Rothman y Südhof sobre los mecanismos que gobiernan el tráfico de vesículas en células eucariotas fue reconocido con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2013. Usando métodos genéticos en levadura (Dr. Sheckman) y ensayos de reconstitución *in vitro* de reacciones de tráfico con extractos de células de mamíferos (Dr. Rothman), se identificaron factores implicados en el tráfico vesicular que resultaron estar conservados entre estos organismos (Clary et al., 1990). Posteriormente se ha comprobado que la maquinaria responsable del tráfico de vesículas a través del sistema de endomembranas está ampliamente conservada en todos los eucariotas, si bien en organismos pluricelulares como plantas y metazoos está expandida. Por ejemplo, en plantas las familias de proteínas Rabs y SNAREs son más numerosas que en hongos y animales (Bassham et al., 2008). Esta mayor complejidad en plantas puede ser debido a su naturaleza sésil que les ha obligado a desarrollar un sistema de transporte que les permita adaptarse a distintas condiciones de crecimiento. De forma general, el tráfico vesicular entre compartimentos comprende cuatro reacciones fundamentales (Fig. 1) (Bonifacino and Glick, 2004) : I) La formación de la vesícula en el orgánulo de origen, que implica la selección del cargo, el reclutamiento de la cubierta, la deformación de la membrana y la escisión de vesícula de la membrana donadora II) El transporte de la vesícula a lo largo del citoesqueleto hasta la membrana diana. III) El reconocimiento de la vesícula por factores de anclaje de la membrana diana. IV) La fusión de la vesícula con la membrana del orgánulo de destino descargando su contenido en el interior.

INTRODUCCIÓN

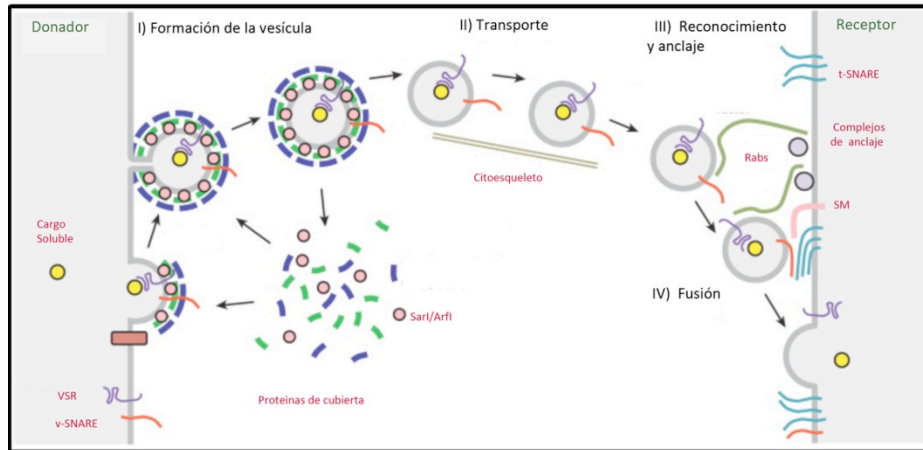


Figura 1. Ciclo de formación y fusión de vesículas de tráfico. En negro están mostradas las etapas del proceso y en rojo los principales factores implicados. Adaptada de Bonifacino y Glick, 2014.

Algunas de las principales familias de proteínas que realizan estas reacciones son:

Proteínas ARF y sus efectores

Las proteínas ARF son pequeñas GTPasas de la familia Ras que participan reclutando los componentes de la cubierta de las vesículas en la membrana donadora. Estas proteínas actúan como un interruptor molecular alternando entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. Los factores GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) inducen el cambio de nucleótido de GDP a GTP mientras que los factores GAP (*GTPase-activating protein*) activan la hidrólisis de GTP (Vernoud et al., 2003). Las proteínas Sar1 (ARF), Sec12 (Sar1-GEF) y Sec23 (Sar1-GAP) intervienen en la formación de las vesículas COPII, mientras que las proteínas Arf1, GBF1 (Arf1-GEF) y ARF-GAP1/GCS1 (Arf1-GAP) participan en la formación de vesículas COPI. Además Arf1 participa en la formación de vesículas en el TGN (Memon, 2004).

Receptores de carga

Los receptores de carga son proteínas trans-membrana de tipo I que sirven de puente entre las proteínas solubles que se encuentran en el lumen del compartimento y la maquinaria de transporte localizada en el citosol. En plantas se han identificado dos familias de receptores de carga soluble vacuolar, la familia VSR y la RMR (Hinz et al., 2007; Luo et al., 2014).

Cubiertas de vesículas

Las cubiertas son estructuras de proteínas que se van ensamblando progresivamente, estabilizando la deformación de la membrana hasta que la vesícula se escinde de la membrana donadora. La cubierta es posteriormente desensamblada para proceder a la fusión de la vesícula con la membrana de destino. Se han descrito 4 tipos de cubiertas de vesículas: COPII, COPI, clatrina (CCVs) y retrómero que funcionan en distintos pasos del tráfico intracelular (Hwang and Robinson, 2009).

a) Vesículas COPII: transportan las proteínas desde los sitios EREs hasta la cara del Cis del Golgi (Contreras et al., 2004). La cubierta de estas vesículas está formada por un complejo de 5 proteínas: Sar1, los dímeros Sec23-Sec24 y Sec13- Sec31 (Marti et al., 2010).

b) Vesículas COPI: median el transporte desde el AG de regreso al RE (Montesinos et al., 2014), así como en el transporte bidireccional dentro de la red del Golgi (Orci et al., 2000). La cubierta está formada por la proteína Arf1 y dos complejos de subunidades múltiples, el complejo F-COP (que está formado a su vez por las subunidades β , γ , δ y ζ) y el complejo COP-B (cubierta exterior formada por las subunidades α , β' y ϵ) (Contreras et al., 2000).

c) CCVs: están involucradas en el transporte de proteínas desde la membrana plasmática a los endosomas (vía endocítica) y en el tráfico de proteínas desde el TGN al PVC en su ruta hacia la vacuola. Estas vesículas están formadas por un complejo de proteínas adaptadores (AP) (Boehm and Bonifacino, 2001) recubiertas de tres cadenas ligeras y de tres cadenas pesadas de clatrina, unidad llamada triskelion, que forman un enrejado poliédrico (Kirchhausen, 2000; Young, 2007).

d) Retrómero: reciclan los receptores VSRs desde los endosomas al complejo de Golgi. El retrómero está compuesto por un trímero de proteínas (Vps26, Vps29a y Vps35) que reconocen el cargo y un dímero de proteínas (SNX) que deforman la membrana para formar las vesículas (Reyes et al., 2011).

Epsinas

Las proteínas de la familia de las Epsinas contienen un dominio conservado ENTH (*Epsin N-Terminal Homologo*) de unión a fosfolípidos de la membrana y múltiples sitios de unión a clatrina, participando en la formación de CCVs (Holstein and Oliviusson, 2005).

SNAREs y proteínas SM

Las proteínas SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein Receptor*) llevan a cabo la fusión entre las membranas de la vesícula y las membranas del compartimento receptor. Las proteínas SNARE se identifican por poseer un motivo característico de 60-70 aminoácidos que forma una estructura helicoidal expuesta en el citosol, las proteínas SNARE se clasifican en dos tipos, Q- y R- SNAREs, en base a la presencia del residuo, glutamina (Q) o arginina (R), conservado en el centro de su dominio SNARE. A su vez las proteínas Q-SNARE se dividen en Qa, Qb, Qc, Qb+Qc- SNAREs. Las proteínas Q-SNAREs se localizan en el compartimento diana, formando un complejo t-SNARE que interacciona en trans con la R-SNARE presente en la vesícula que se va a fusionar. El complejo trans-SNARE está por tanto formado por los tres hélices de las Q-SNARE y una de la R-SNARE entrelazadas entre sí. La interacción entre estos dominios fuerza una estrecha asociación entre las dos membranas favoreciendo su fusión. Las proteínas tipo Sec1/Munc19 (SM) se unen a las proteínas Qa-SNARE a través de diferentes mecanismos, y regulan la interacción trans-SNARE-SNARE y por ende la fusión de membranas (Sudhof and Rothman, 2009).

Enzimas modificadoras de fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos (PIs) son lípidos minoritarios en las membranas que cumplen un papel esencial en tráfico vesicular al reclutar a la maquinaria de tráfico a dominios específicos de cada compartimento. Los PIs comprenden al fosfatidilinositol (PtdIns) y sus distintas formas fosforiladas en las posiciones 3, 4 y 5 del inositol. En plantas, se han identificado cinco formas fosforiladas de PIs, PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,5)P y PI(4,5)P (Thole and Nielsen, 2008). Cada PI se localiza enriquecido en las membranas de orgánulos específicos en forma de microdominios, contribuyendo así a determinar su identidad y función. Además, los PIs regulan el tráfico de membranas de una manera compartimento-específico mediante dos mecanismos diferentes. El primero es reclutando las proteínas efectoras necesarias para el inicio y terminación del tráfico de membranas de manera secuencial a través de la producción y eliminación de PI por sus enzimas reguladoras. El segundo implica la regulación directa de la actividad de las proteínas de la membrana. Es decir, los PI pueden tener funciones duales en el reclutamiento de proteínas y proveer la regulación compartimento-específica de las proteínas de su membrana (Thole and Nielsen, 2008).

4. La vacuola en plantas: vacuolas líticas y vacuolas de reserva

Las vacuolas pertenecen al sistema de endomembranas y son consideradas un destino final de la ruta biosintética y de la ruta endocítica. Se han reportado posibles eventos de fusión de la vacuola con la membrana plasmática que resultarían en la secreción de sus contenidos al espacio extracelular (Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011), pero este es un fenómeno que aún no está firmemente demostrado y que en cualquier caso sería minoritario o activo solamente en condiciones muy particulares. Las vacuolas participan en diversos procesos celulares como son: 1) hidrólisis de constituyentes celulares, incluyendo orgánulos enteros; 2) regulación de pH y de la homeostasis iónica; 3) mantenimiento de la turgencia celular, generando la fuerza para dirigir la expansión celular; 4) almacenamiento de nutrientes, proteínas, pigmentos y compuestos tóxicos (Zouhar and Rojo, 2009).

Las vacuolas de plantas tienen características específicas que las diferencian de las vacuolas de hongos y de los lisosomas animales, que son los compartimentos equivalentes en estos organismos. Una característica particular es el gran tamaño que pueden alcanzar, hasta el 90% del volumen de las células maduras. Este gran tamaño es una adaptación esencial de las plantas, que permite un crecimiento energéticamente barato a estos organismos autótrofos con el que pueden colonizar el medio circundante. Además estos depósitos mantienen la homeostasis citosólica en un medio del que las plantas no pueden escapar. Otra característica especial de las plantas es la existencia de tipos de vacuolas distintas que pueden coexistir en una misma célula vegetal (Paris et al., 1996; Zouhar and Rojo, 2009). En células vegetales se han identificado dos tipos principales de vacuolas, las vacuolas líticas que están presentes en la mayoría de las células vegetativas de las plantas y las vacuolas de reserva (VR) que son específicas de estos organismos y que están presentes principalmente en tejidos de reserva de las semillas. La coexistencia de ambas vacuolas en ciertos tipos celulares implica que debe haber rutas independientes de tráfico a cada clase de vacuolas. La vacuola lítica es un compartimento con pH ácido, rico en enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, glicosidasas) que se asemeja en función a los lisosomas de células animales. La vacuola lítica está principalmente involucrada en el mantenimiento de la turgencia celular, la degradación de macromoléculas, así como el almacenamiento de iones y metabolitos secundarios y el secuestro de xenobioticos. La vacuola lítica se identifica por la presencia en su tonoplasto de la proteína acuaporin, Υ -TIP (Paris et al., 1996). Las VRs se encuentran principalmente en semillas y están especializadas en el almacenamiento de proteínas de reserva y defensa (como

INTRODUCCIÓN

albuminas, globulinas, lectinas). Las VRs se identifican por la presencia de la proteína α -TIP en su membrana y se caracterizan por su baja actividad lítica, su pH neutro y su alta concentración de proteínas de reserva (Paris et al., 1996). En plantas superiores, las proteínas de reserva son sintetizadas y almacenadas durante el desarrollo de la semilla para ser utilizadas como fuente de azufre, carbono y nitrógeno durante la germinación. La cantidad de proteína presente en las semillas es variable, del 10-12% en cereales y hasta un 40% (peso seco) en ciertas legumbres y semillas oleaginosas. Las proteínas de reserva se clasifican en base a su solubilidad en cuatro grupos: 1) albuminas que son solubles en agua; 2) globulinas que son solubles en soluciones salinas; 3) prolaminas, que son solubles en mezclas alcohol/agua (60-70% etanol o 50-55% de propanol) y 4) glutelinas que son solubles en soluciones alcalinas o ácidas (Shewry et al., 1995). Las globulinas son las proteínas de reserva más extendidas en la naturaleza y se encuentran en plantas dicotiledóneas y en algunas plantas monocotiledóneas como la avena y el arroz. Las globulinas predominantes se clasifican en dos grupos, 7-8S (tipo vicilina) y 11-12S (tipo legumina), de acuerdo a su coeficiente de solubilidad (Shewry et al., 1995). En *Arabidopsis thaliana*, las principales proteínas de reserva son globulinas las 12S y las albuminas 2S, que son procesadas en el PVC y en la vacuola (Otegui et al., 2006), por lo que la presencia de formas sin procesar constituye un indicador de defectos en su transporte a vacuola.

5. Rutas de tráfico de proteínas a vacuolas en plantas

En plantas se han descrito tres rutas generales de transporte de proteínas hacia las vacuolas, la ruta biosintética, la endocítica y la autofágica. La autofagia es un mecanismo que secuestra parte del citosol transfiriéndolo al interior de la vacuola para su degradación. Esta ruta implica la formación de vesículas llamadas fagosomas, probablemente derivadas del RE, que se fusionan directamente a la vacuola y es independiente de las rutas endocíticas y biosintéticas. Estas dos últimas rutas también son independientes en los primeros pasos, pero convergen en el TGN, que en plantas funciona como endosoma temprano ("*Early endosome*", EE). En el TGN/EE llegan las proteínas provenientes del AG por la ruta biosintética y se unen a las proteínas endocitadas provenientes de la MP y del espacio extracelular. Desde el TGN/EE las proteínas vacuolares son seleccionadas específicamente por receptores de cargo y dirigidas al PVC/MVB, desde donde los receptores de cargo son reciclados al TGN por las vesículas del retrómero, mientras que el cargo acaba en la vacuola tras la fusión entre esta y el PVC. Hay evidencias de que el transporte entre el TGN y el PVC puede ser mediado por CCVs, aunque otros autores defienden que este proceso no requiere transporte vesicular sino maduración

INTRODUCCIÓN

del TGN para formar el PVC (Scheuring et al., 2011). Por otro lado se han descrito dos formas de transporte de proteínas de reserva a las VRs que parecen ser específicas de plantas. Uno de estos mecanismos conlleva la selección de las proteínas de reserva en el AG, su segregación a la periferia de las cisternas y su empaquetamiento en vesículas densas (DVs) (Hinz et al., 2007; Hinz et al., 1999; Hohl et al., 1996), que se fusionarían con un PVC posiblemente específico para esta ruta (Shen et al., 2011). Las proteínas vicilina, legumina, cruciferina y α Tip son transportadas por este tipo de vesículas en plantas como guisantes, arroz, soja y arabidosis. Las DVs tienen un contenido luminal electrón denso debido a la alta concentración de proteínas de reserva y parecen carecer de cubierta de proteínas. Se ha propuesto que el mecanismo de selección y posiblemente el de formación de la vesícula depende principalmente de la formación de agregados de las proteínas cargo y la deformación de la membrana desde el interior del lumen, aunque también podrían participar receptores de señales de direccionamiento vacuolar como los RMR (Hinz et al., 2007; Shen et al., 2011). Otro mecanismo de transporte a vacuolas descrito en calabaza, ricino y trigo es el mediado por vesículas PAC (*"Precursor accumulating vesicles"*) que transportan proteínas directamente del RE a la vacuola (Hara-Nishimura et al., 1998). La contribución de cada una de estas rutas al transporte vacuolar en distintos tipos celulares o en distintas especies de plantas es desconocida, principalmente debido a que no se han caracterizado la maquinaria y los mecanismos que actúan en cada ruta.

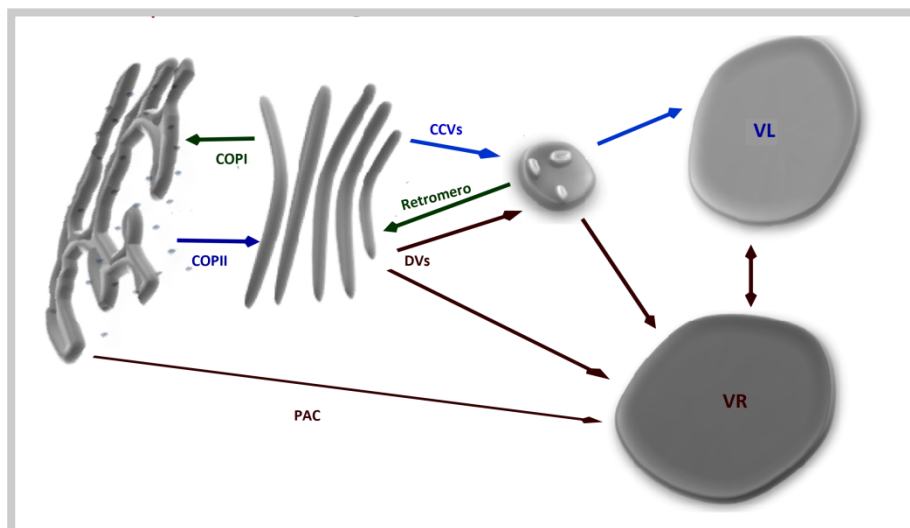


Figura 2. Tráfico de proteínas a través de la ruta biosintética hacia la vacuola: las flechas en azul representan una posible ruta común para todas las células eucariotas, dependiente de CCVs. Las flechas en marrón representan las rutas específicas de plantas dependientes de DVs y PAC, Las flechas en verde corresponden al transporte retrogrado. Adaptada de (Pereira et al., 2014).

6. Señales de direccionamiento a vacuolas de proteínas solubles de plantas

Para que las proteínas solubles del sistema de endomembranas sean dirigidas específicamente a la vacuola requieren de señales positivas que sean reconocidas por proteínas receptoras (Neuhaus and Rogers, 1998; Vitale and Raikhel, 1999). A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, donde la señal de transporte de proteínas a los lisosomas viene dada por la adición de un residuo de manosa-6 fosfato durante su paso a través del AG, en las plantas y en los hongos, las proteínas “carga” solubles destinadas a la vacuola tienen la información de direccionamiento vacuolar codificada en su propia secuencia peptídica. Para que un péptido sea considerado una verdadera señal de direccionamiento vacuolar deberá ser necesario y suficiente para llevar a cabo esta función (Vitale and Raikhel, 1999). Las señales de direccionamiento a vacuolas (VSS, *vacuolar sorting signals*) de plantas se clasifican en tres categorías de acuerdo con su función y homología con otras señales (Vitale and Hinz, 2005): señales de direccionamiento vacuolares secuencia-específica (ssVSS: *sequence specific VSS*); señales de direccionamiento vacuolares C-terminales (ctVSS: C-terminal VSS); determinantes físicos (VRSS: *physical structure VSS*).

Señales secuencia específica (ssVSS)

Se caracterizan porque contienen la secuencia consenso NPXR/NPIR que es reconocida por los receptores de la familia VSR (Vacuolar Sorting Receptor). Estudios recientes demostraron que los tres aminoácidos que preceden a la secuencia conservada NPIR, se unen al dominio asociado a proteasa (“protease associated domain”) de las proteínas VSR, mientras que la secuencia NPIR se uniría al dominio central de la región N-terminal de los VSR (Luo et al., 2014). Las ssVSS se han identificado principalmente en propeptidos en la región N-terminal de las proteínas, aunque pueden encontrarse también en otras posiciones (Vitale and Hinz, 2005). Este tipo de secuencias se han encontrado principalmente en proteínas que se dirigen a las vacuolas líticas, como la aleuraina de cebada y esporamina de patata dulce, pero también en proteínas específicas de vacuolas de reserva, como la albumina 2S y la ricina.

Señales C-terminales (ctVSS)

Las ctVSS han sido identificadas principalmente en proteínas de vacuolas de reserva. Son señales que no presentan motivos conservados y tienen una longitud variable, en el caso de la

INTRODUCCIÓN

faseolina tiene solo cuatro tiene 20 aminoácidos (Vitale and Raikhel, 1999). Una característica común es que son motivos ricos en aminoácidos hidrofóbicos y que necesitan estar expuestas en el extremo carboxilo para ser funcionales. Se ha comprobado que VSR1 puede reconocer la señal ctVSS de las proteínas de reserva 2S albumina y 12S globulina, de una manera dependiente de calcio (Shimada et al., 2003).

Señales estructurales (VRSS)

Son señales codificadas en la estructura terciaria de la proteína y la mayoría se ha encontrado en proteínas de reserva. La proteína fitepsina contiene un dominio tipo saponina de 104 aa. La delección de este dominio provoca la secreción de la proteína truncada y el exporte del RE, sin afectar su actividad enzimática (Tormakangas et al., 2001).

Tabla 1: Señales de direccionamiento vacuolar descritas en plantas.

VACUOLA	SEÑAL	PROTEÍNA	SECUENCIA	POSICION		BIBLIOGRAFIA
LV	ssVSS	Esporoamina	SRFNPIRLPTTHEPA	N-terminal	N+S	Matsuoka y col., 1990
		Aleuraina	SSSSFADSNPIRVTDRAAST	N-terminal	N+S	Holwerda y col., 1992
		Ricina	SLLIRPWPNFN	Interno	N+S	Frigerio y col., 2001
PSV	ssVSS	Albumina 2S (Ricinus communis)	STGEEVLRMPGDEN	Interno	N+S	Jolliffe y col., 2003
		Globulina 11 S	GNIFRGF	Interno	S	Petrucci y col., 2007
	ctVSS	Lectina	VFAEIAANSTLVAE	C-terminal	N+S	Bendnarek y col., 1990
		Quitinasa A	GLLDTM	C-terminal	N+S	Neuhaus y col., 1991
		Faseolina	AFVY	C-terminal	N+S	Frigerio y col., 1992
		Albumina 2S (Brazil nuts)	PSRCNLSPMRCPMGGSIAGF	C-terminal	N+S	Saalback y col. 1996
		β -conglucina subunidad α	PLSSILRAFY	C-terminal	N+S	Nishizawa y col., 2004
		Legumina	Dominios multiples	Interno	S	Saalback y col.1991
	psVSS	Fitoheماغlutinina	bucle interno	Interno	N	Von Schawen y Crispeels. 1993
		Fitepsina	bucle interno	Interno	N	Törmakangas y col., 2001
CV	ctVSS	Globulina 11S	KISA	C-terminal	S	Petrucci y col., 2007

Las secuencias descritas como necesarias (N) y suficientes (S) para el direccionamiento vacuolar se etiquetan como "N +S". LV: Vacuola Lítica. VR: Vacuola de Reserva. CV: vacuola central (Vitale and Hinz, 2005).

7.-Receptores de señales de direccionamiento a vacuolas

Las proteínas receptores de señal de direccionamiento vacuolar son proteínas transmembrana de tipo I que actúan como puente entre las proteínas solubles que se encuentran en el lumen del orgánulo y la maquinaria de tráfico localizada en la parte citosólica. En arabidopsis se han

INTRODUCCIÓN

identificado dos familias de receptores de señales de direccionamiento vacuolar que son los VSRs y los RMRs (De Marcos Lousa et al., 2012; Park et al., 2005).

Familia de receptores VSR

El primer receptor de señal de direccionamiento vacuolar identificado en plantas fue la proteína BP80 aislada por afinidad al ssVSS del precursor de aleuraína a partir de una fracción concentrada de vesículas cubiertas de clatrina de cotiledones de guisante (Kirsch et al., 1994). Posteriormente fue identificada una proteína homóloga de BP80 en *Arabidopsis*, la proteína AtELP (VSR1), que se unía, de manera dependiente de pH, al ssVSS de aleuraína y esporamina pero no con el ctVSS de la lectina de cebada o de la quitinasa de tabaco (Ahmed et al., 1997; Ahmed et al., 2000). BP80 y AtELP se localizaban en el AG y el PVC, pero no estaban presentes en DVs (Hinz et al., 1999; Sanderfoot et al., 1998), indicando que mediaba una ruta a vacuola independiente de estas vesículas que posiblemente implicaba vesículas recubiertas de clatrina. También se encontró otro homólogo de BP80 en semillas de calabaza, el receptor PV72. Este receptor estaba implicado en el transporte de precursores de proteínas de reserva, desde el RE a la vacuola sin pasar por Golgi, a través de las vesículas PAC (Shimada et al., 1997; Shimada et al., 2002). Además, PV72 se asoció al transporte de proteínas de reserva mediado por DVs (Petruccioli et al., 2007). Todas estas proteínas forman parte de una familia conservada en plantas denominada "Vacuolar Sorting Receptors" ó VSRs. En *Arabidopsis*, la familia de VSRs consta de 7 miembros, VSR1 a VSR7 (Shimada et al., 2003). Se ha comprobado que VSR1, VSR3 y VSR4 están implicados en el transporte de proteínas a vacuolas de reserva 12S y 2S en semilla y de proteínas solubles que se dirigen a la vacuola lítica en las células vegetativas (Shimada et al., 2003; Zouhar et al., 2010). La deposición de proteínas de reserva en VRs dependiente de VSR1, VSR3 y VSR4 durante la embriogénesis es esencial para el vigor germinativo y el establecimiento de la plántula (Zouhar et al., 2010).

Los receptores VSR son proteínas transmembrana tipo I que ciclan entre el TGN y el PVC (De Marcos Lousa et al., 2012). La región N-terminal (VSR-NT) localizada en el lumen está compuesta por un dominio asociado a proteasa, un dominio central y tres repeticiones del dominio EGF ("Epidermal Growth factor"), que están implicados en la unión a las señales de direccionamiento vacuolar de las proteínas cargo solubles (Luo et al., 2014). En la estructura cristalina del dominio asociado a proteasa de VSR1 (VSR1AP) unido a ssVSS de aleuraína se ha podido constatar que la secuencia $_{95}\text{RGxCxF}_{100}$ contacta con tres aminoácidos de la secuencia

INTRODUCCIÓN

de direccionamiento vacuolar consenso NPIR. Se ha descubierto tres sitios de N-glicosilación en la región N-terminal de VSR1: N143 dentro del dominio AP, N289 en la parte central y N429 en EGF. Esta N-glicosilación regula la afinidad de VSR1 con su ligando cargo soluble, estabilizando dicha unión (Shen et al., 2014). Los VSR contienen un dominio transmembrana (TMD) y una cola citoplasmática (VSR-CT) orientada hacia el citosol. La región VSR-CT está implicada en dirigir a las proteínas VSR y su cargo a la vacuola. En el VSR-CT se identificó el motivo conservado YMPL que concuerda con el consenso Yxx- ϕ (donde x es cualquier aminoácido y ϕ es un residuo hidrofóbico) de interacción con la μ -adaptina de los complejos adaptadores AP. Específicamente, el motivo YMPL de VSR interacciona con la subunidad μ de AP1 y AP4 de plantas y mamíferos, pero no con la subunidad μ de AP2 (Happel et al., 2004; Sanderfoot et al., 1998). Además, VSR1 se une al dominio ENTH Epsina (Song et al., 2006) y al retromero para su reciclaje desde el PVC al TGN (Oliviusson et al., 2006).

La familia de los receptores RMR

Las proteínas RMR son proteínas integrales tipo I y contienen un péptido señal seguido por una región luminal con un dominio asociado a proteasa homólogo al de los receptores VSRs; un dominio transmembrana y una región citoplasmática que consta de un dominio RING-H2 y de una región rica en el aminoácido serina. Se han encontrado miembros de esta familia de receptores en hongos, plantas y metazoa. En *Arabidopsis* se han identificado seis genes de la familia RMR, AtRMR1-6 (Park et al., 2005; Zouhar et al., 2010). AtRMR1 se expresa en la mayoría de los tejidos de *Arabidopsis* independientemente de la etapa de crecimiento de la planta). Los análisis del efecto de la expresión de mutantes de delección sugieren que AtRMR1 está implicado en el transporte de la faseolina a la VR pero no en el transporte de aleurina y esporamina a las vacuolas líticas. En consonancia con estos datos, AtRMR2 se une específicamente a las ctVSSs de quitinasa de tabaco y lectina de cebada, pero no se une a ssVSS de aleurina (Park et al., 2005). Sin embargo, los mutantes, por pérdida de función, de los receptores: *rmr1*, *rmr2*, *rmr4*, *rmr5* y *rmr6*, y dobles mutantes nulos *rmr1rmr2* y *rmr3rmr4* no se ven afectados en el transporte de las proteínas de reserva 2S albumina y 12S globulinas y faseolina, ni tampoco en el transporte de las proteínas marcadoras AALP-GFP Y CPY-GFP a vacuola lítica de células vegetativas (Zouhar et al., 2010). por lo que la contribución de estos receptores al tráfico vacuolar no está determinada.

8. Identificación de factores implicados en el transporte a vacuola en plantas

La maquinaria de tráfico está ampliamente conservada en todos los reinos. Así, es posible identificar por homología de secuencia genes que codifican para proteínas de familias implicadas en tráfico (SNARES, proteínas SM, Rabs, AGDs, etc), pero no es posible determinar en que ruta participan ni, por tanto, cual es su función en plantas (Bassham et al., 2008). Además, la gran redundancia genética y en otros casos, la función esencial de muchos de los genes, dificulta la caracterización por genética reversa de los genes implicados en tráfico. En los últimos años se han desarrollado estrategias de genética directa que, junto con ensayos transitorios (Denecke et al., 2012), han permitido identificar numerosos componentes de la maquinaria de tráfico intracelular en plantas, y en particular del tráfico a vacuolas.

En el laboratorio de la Doctora Hara-Nishimura se desarrolló una estrategia basada en la búsqueda de mutantes *maigo* (MAG) de *Arabidopsis thaliana* que acumulan precursores de 2S albuminas y 12S globulinas en semillas (Shimada et al., 2006). Estas proteínas se procesan en el PVC y en la vacuola, por lo que en mutantes en los que no alcanzan estos compartimentos, se acumulan precursores. Con esta estrategia se han identificado de una población mutagenizada con etil metanosulfonato (EMS) los mutantes *maigo1*, que corresponde al componente del retrómero VPS29 (Shimada et al., 2006), *maigo2* que corresponde a la proteína RINT/TIP20 que forma parte de un complejo localizado en el RE (Li et al., 2013), *maigo4* que corresponde a un factor de anclaje Atp115 localizado en la cara cis del AG (Takahashi et al., 2010) y *maigo5* que corresponde a SEC16A que está implicado en el transporte de proteínas desde el RE al AG (Takagi et al., 2013).

En otro rastreo se buscaron supresores del mutante *zigzag* (*zig-1*) de pérdida de función de la proteína Qb-SNARE VTI11 que está implicada en el tráfico de vesículas entre el TGN y las vacuolas (Niihama et al., 2009). De esta manera se identificaron los mutantes *zip1*, *zip2*, *zip3* y *zip4* que estaban mutados en VTI12, VPS41, VPS35 y μ AP-3, respectivamente .

En los últimos años, varias líneas transgénicas que expresan marcadores vacuolares fluorescentes (GFP: δ -TIP, SP-GFP-2SC, y GFP-CT24) han sido mutagenizadas por EMS y usadas en ensayos de rastreo genético para la identificación de nuevos factores implicados en el tráfico a vacuolas o en el mantenimiento de la integridad y funcionamiento estos compartimentos (Rojo and Denecke, 2008; Zouhar and Rojo, 2009). Los factores de tráfico vacuolar que se conocían en el momento de comenzar esta tesis se muestran en la Tabla 2.

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Factores identificados en tráfico de proteínas a vacuola de reserva.

Gen	AGI	Localización	Ruta de Tráfico	Marcadores afectados	Evidencia
ADL6	At1g10290	AG		Spo-GFP, GFP-EBD	DN: At
AGD7	At2g37550	AG	AG a ER	Spo-GFP, faseolina, Inv-GFP, g-COP, ST-GFP, GH	OE: At
ARF1	At2g47170	AG, endosomas	AG a RE	Amy, Amy-Spo; ST-GFP, Erd2-GFP, Spo-GFP; H-ATPasa-GFP; GFP-Rer1b, GFP-sed5	
EPSIN1	At5g11710	AG, PVC, actina	RTV	Spo-GFP	Mut: At
GFS10	At4g35870	ND	RTV	Proteínas de reserva, GFP-CT24	Mut: At
GNL1	At5g39500	AG	AG a RE, RTV	SecGFP, Aleu-GFP, Pin1, Pin2	Mut: At
GRV2/KAM2	At2g26890	punteado	RTV	Proteínas de reserva, GFP-2SC	Mut: At
KAM1/MUR3	At2g20370	AG	RTV	GFP-2SC	Mut: At
MAG1/VPS29	At3g47810	PVC	RTV	Proteínas de reserva, GFP-CT24	Mut: At
MAG2	At3g47700	ER	ER to AG	Proteínas de reserva	Mut: At
MAG4/Atp115	At3g27530	AG	RE a AG	Proteínas de reserva	Mut: At
MAG5/SEC16A	At5g47480	ER	RE a AG	Proteínas de reserva, ST-GFP	Mut: At
OsGAP1	N/A	TGN or PVC	RTV YPM	H-ATPase-GFP, Ca-ATPase-GFP y Aleu-GFP	DN: At
RABmc	N/A	AG, PVC	RTV	Aleu-GFP	DN: Mc
RABF2A/RHA1	At5g45130	PVC	RTV	Aleu-GFP, Spo-GFP	DN: At
RABF2B/ARA7	At4g19640	PVC, AG	RTV	Aleu-GFP	DN: Nt
RMR1	At5g66160	AG, DV, PVC, Vac	RTV	Faseolina	DN: At
SYP21	At5g16830	PVC	RTV	Amy-Spo, BopTIP-GFP, YFP-SYP22, TIP1;1-YFP	OE, DN: Nt
SYP22/SGR3	At5g46860	PVC, Vac	RTV	TTG2	Mut: At
TFL1	At5g03840	PM, Vac, puteado	RTV	VacPerox, GFP-CTPPBL, VAC2	Mut: At
VCL1-1	At2g38020	Vac, PVC	RTV	AtAleu	Mut: At
VPS9	At3g19770	ND	ND	PIN1-GFP, GFP-RABF2B, RabF1-GFP	Mut: At
VPS35A, VPS35B, VPS35C	At1g75850, At2g17790, At3g51310	PVC	RTV	Proteínas de reserva	Mut: At
VSR1/GFS1, VSR4/MTV2, VSR3	At3g52850	AG, CCV, DV, PVC	RTV	Proteínas de reserva, GFP-CT24, VAC2	Mut: At
VTI11/ZIG1	At5g39510	PVC	RTV	Aleu-GFP	Mut: At
VTI12	At1g26670	TGN	RTV	Proteínas de reserva, VacPerox, GFP-CHI, BL, VAC2	Mut: At

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis es el de ahondar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que efectúan el transporte de proteínas a vacuolas en plantas. Como punto de partida para la consecución de este objetivo, se utilizó una estrategia de genética directa basada en el marcador vacuolar VAC2, que cuando se secreta en mutantes afectados en el tráfico vacuolar provoca la terminación temprana del meristemo (mutantes *modificados en el transporte a vacuolas, mtv*). Nuestra hipótesis era que la identificación y el análisis de los genes cuya mutación provocara el fenotipo *mtv* nos permitiría conocer en mayor profundidad cómo se ejecuta y regula el transporte de proteínas a vacuolas en plantas y qué rutas median este transporte. Los objetivos concretos que planteamos para avanzar en el objetivo general fueron:

Objetivos específicos

1. Identificar nuevos mutantes *modificados en el transporte a vacuolas (mtv)*.
2. Identificar y caracterizar molecular y funcionalmente los genes *MTV* afectados en los mutantes *mtv* aislados.
3. Determinar las rutas de transporte en las que participan los genes *MTV* identificados y testar genéticamente los modelos de tráfico a vacuola que se han propuesto en plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Vectores de clonación y transformación

- Plásmidos con origen de replicación de *E. coli*: pDONR207 y pDONR221 (Invitrogen, www.invitrogen.com).
- Plásmidos binarios: pGWB03 y pGWB04 (Nakagawa y col., 2007), pUbi N-RFP y pUbi N-GFP (Grefen y col., 2010).
- Plásmidos para expresión de proteínas en procariotas: pGEX-2T, modificado para ser compatible en clonajes por recombinación homóloga mediante la inserción de un cassette de clonaje Gateway en el MCS (GE-Healthcare).
- Plásmidos para experimentos de purificación en tándem de proteínas, pKCTAP (con las correspondientes colas en el extremo C-terminal de la proteína) y pKNGSTAP (fusión N-terminal) (Van Leene y col., 2008).

2. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios a una dilución de 1:1000 salvo indicación contraria: anti-Aleuraína (Ahmed et al., 2000); anti-CPY (Rojo et al., 2003b); anti-AGD5 1:5000 (Liljegren et al., 2009); anti-CHC (ciencias biológicas 610499 de BD); anti-GST (Carl Roth 3998), 1:2000; anti-SYP21, anti-VSR, anti-VTI11, anti-SEC12 y anti-RGP1 (proporcionados por N. Raikhel); anti- γ AP-1 (proporcionado por I. Hwang); anti-BiP (Santa Cruz Biotechnology sc-33757); anti-actina (sigma-Aldrich A04080), 1:2000; anti-DET3 (proporcionado por K. Schumacher), 1:2000; anti-MTV1 (este trabajo). Los anticuerpos secundarios (anti-ratón NA931V y anti-conejo NA934V) se usaron a una dilución 1:10000.

3. Cepas bacterianas

- Para la obtención y purificación de plásmidos se ha utilizado la cepa de *E. coli DH5 α* .
- La expresión de proteínas recombinantes tanto en su forma silvestre como mutante se llevó a cabo en bacterias de *E. coli BL21 DE3*.
- Para la expresión transitoria en *N. benthamiana* y la transformación estable de *A. thaliana* se utilizó la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*, que contiene el plásmido pGV2260.

4. Material vegetal

- Las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se generaron en la accesión Columbia-0 (Col-0).
- Los mutantes *mtv1-1*, *mtv3-1* y *mtv4-1* fueron aisladas de una población mutagenizada por EMS derivada de la línea transgénica L1 (Sanmartin et al., 2007). La línea L1 se generó por transformación estable de plantas del ecotipo Ler con una construcción que expresa la proteína CLV3 fusionada a la señal de localización vacuolar de la lectina de cebada bajo el control del promotor constitutivo 35S (Rojo et al., 2002).
- Líneas de inserción T-DNA: *mtv4-2* (Salk_079928; idéntico a nev-7 en Liljegren et al., 2009), *mtv1-2* (Salk_061811), *mtv3-2* (SALK_1147721C) y *2b-2* (SALK_1200020C). Los alelos SALK T-DNA fueron utilizados en la mayor parte de los análisis funcionales de *MTV1* y *MTV4*, a menos que se indique de otra forma.
- Líneas de expresión de marcadores subcelulares: wave2R (=mCherry-RabF2b/ARA7), wave13R (=mCherry-VTI12), wave22R (=mCherry-SYP32), wave129R (=mCherry-RabA1g) (Geldner et al., 2009); SYP61-CFP (Robert et al., 2008); Vha1-RFP (Dettmer et al., 2006); prPIN1: PIN1-GFP (Benkova et al., 2003); prPIN2: PIN2-GFP (Abas et al., 2006); SP-RFP (Hunter et al., 2007); CLC-GFP (Konopka et al., 2008).
-

5. Cultivo de bacterias

Las diferentes cepas de *E. coli* se cultivaron a 37° en LB (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) y para cultivos en medio sólido, agar 18 g/l).

Las cepas de *A. tumefaciens* C58C1 se cultivaron a 28° en LB (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) y para cultivos en medio sólido, agar 18 g/l.

Para conservar las cepas originales y los transformantes de *E. coli* y *A. tumefaciens* durante periodos cortos de tiempo se mantuvieron a 4° C en placa de medio LB sólido con el antibiótico apropiado. La conservación por largos periodos de tiempo se realizó resuspendiendo las células en una solución de glicerol al 20% y manteniéndolas a una temperatura de -80°C.

6. Cultivo *in vitro* de *Arabidopsis*

Las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron con una mezcla de lejía comercial al 75% con 0.1% de Tween 20 (SIGMA) durante 10 minutos. Tras realizar 5 lavados con agua estéril, se estratificaron a 4°C durante 2-3 días y se germinaron en placas Petri en medio Murashige y

MATERIALES Y MÉTODOS

Skoog (MS Duchefa; 4.7 gr por litro de agua, pH 5.7) suplementado con 1 % de sacarosa, además de 0.7 o 1.2 % de agar, en caso de crecimiento horizontal o vertical, respectivamente, y se cultivaron en cámaras climáticas; a una temperatura de 22⁰C, humedad relativa del 60%, con ciclos de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

7. Cultivo de plantas en tierra

Las semillas se germinaron directamente en una mezcla de sustrato universal y vermiculita (3:1). Tras la estratificación (2-3 días), las plantas crecieron a 22⁰C de temperatura y 60% de humedad en invernadero o en cámaras climáticas en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

8. Transformación de *A. thaliana*

La transformación de *Arabidopsis* se realizó por infiltración de las inflorescencias de plantas cultivadas en tierra durante 5 semanas con una suspensión de *A. tumefaciens*, que portaba la construcción de interés, en medio 0.5X MS suplementado con sacarosa (5%), BAP (11ng/mL) y agente surfactante Silwet L-77 (0.02%). La selección de plantas transgénicas se llevó a cabo en medio 1x MS al que se añadieron los antibióticos correspondientes.

9. Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Se creció un cultivo de *A. tumefaciens* en 12 ml de medio LB con antibióticos de selección a 28⁰C durante 15 horas. El cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 2.5 ml de solución de inducción (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH=5.5, 150 μ M de acetosiringona) y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 2-3 horas en oscuridad. Las bacterias se infiltraron a una O.D de 0.2 con jeringas de 1 ml sin aguja, introduciendo el cultivo por el envés de la hoja.

10. Cartografía génica

Se utilizaron marcadores moleculares tipo SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms (Bell y Ecker, 1994) y CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (Konieczny y Ausubel, 1993) presentes en las bases de datos de *Arabidopsis thaliana* TAIR y Marker Tracker. También se diseñaron nuevos marcadores tipo SSLP y CAPS, que recibieron el nombre del BAC en el que están localizados; en el caso de los marcadores CAPS, se añadió además el nombre la enzima de restricción utilizada (ver Tabla 3A y 3B).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3A. Marcadores tipo SSLP y tipo CAPS diseñados para la identificación de MTV1 y MTV3, y cebadores empleados en la resolución de los mismos.

Marcador	Tipo	Posición	Gen	Col-0 (pb)	Ler (pb)	Cebadores: Secuencia de cebadores
nt204	sslp	5.6	AT3G16400- AT3G16410	140	130	NT204F: TGGAAAGCTCTAGAAACGATCG NT204R: ACCACCTAAACCGAGAATTGG
MKP6	sslp	6		250	220	MKP6F: TCTGGTGCCTGGACACGAC MKP6R: CTCTCTTTTCATACATCTC
MVE11	Sslp	6.45	at3g18770- at3g18773	185	166	MVE11F: AGTAGACGATATTGAGCAGA MVE11R: CAAGATCTAAACCGAAGAC
MCB22 RasI	Caps (Ras I)	6,5	at3g18860	575	321+254	MCB22 RasI F (Rsa I): GTACGCTGGTCTCTTTCT MCB22 RasI R (Rsa I): GTTTAAACAAGCATCTCGGA
K13E13 Mbol	Caps (Mbol)	6,53	At3g18940- At3g18950	350	212+139	K13E13 Mbol F: GTCAGCGTGGAGGTTTTCTA K13E13 Mbol R: TGATGCGTGTCTCTGCAGGA
MV111	sslp	6.67	At3g19270- At3g19280	115	100	MV111 F: GAGATTGATCTAGTAGTTTC MV111 R: GCAATGTAAAATACTCGAC
MLD14	sslp	6.748	at3g19460	145	127	MLD14F: TCTCTGCTTATTCTATTCC MLD14R: CTCCAAAATAGTCTCTTC
MLD14 HinfI	Caps (HinfI)	6,76	AT3G19510	388	110+228	MLD14 HinfI F: AATCCCTTCTCACGGTTTGAG MLD14 HinfI R: ACAAGTATTTAAACCTTTGCTGA
T31J18 RasI	Caps (Ras I)	6,77	at3g19530- at3g1940	246+117	364	T31J18 RasI F (Rsa I): CTATATCTGGTTAGGCCTC T31J18 RasI R (Rsa I): CCTCATTAAATCTCTGTGA
MPN9 NaeI	Caps (NaeI)	6,89	AT3G19840	388	226+162	MPN9 NaeI F: GAACGTAATCTCAGCCGT MPN9 NaeI R: GAGCATGAGCAACATACAG
MAL21 HhaI	Caps (HhaI)	7,01	AT3G20090	233+323	557	MAL21 HhaI F: -GAAGCTCGAATCTCAGT MAL21 HhaI R: ACCAAACCTACACCGAC
MAL21 MseI	Caps (MseI)	7,05	AT3G20200	217+120	337	MAL21 MseI F: CTCTGCAAAAGCGCAAATC MAL21 MseI R: CACCAATATTGAGGCTTAGC
MQC12	Sslp	7,1	at3g20440.1	99	91	MQC12 F: GCTTATTATACACAGCTG MQC12 R: CAATTTCATCGGGAAG
MOE17	sslp	7,3	at3g20880- at3g20890	99	84	MOE17 F: CTACATATAT ATTTTATATA AC MOE17 R: CTAAGGTTAAGATATATG
MSA6	sslp	7.4		250	196	MSA6F: AGGTTTGGGATTTGTTG MSA6R: CTCTTGTTTGCTCTGTGG

Tabla 3B. Marcadores tipo SSLP y tipo CAPS diseñados para la identificación de MTV4 y cebadores empleados en la resolución de los mismos.

Marcador	Tipo	posición	Gen	Col-0 (pb)	Ler (pb)	Cebadores: Secuencia de cebadores
F6N7	sslp	21.4	At5g52550	175	160	F6N7F: CTACCTCGACTAATCTCTCC F6N7R: CCTCCACTCAACACATCATC
K19P17	sslp	21.9	At5g53960	120	104	K19P17F: GCGATGTCATCACATCGTC K19P17R: CTCAGACTCGATCCCTACC
K18G13	sslp	21.99	AT5G54150- AT5G54160	194	174	K18G13F: CACCTTACTTAATTCACCTGC K18G13R: CCAGATTCGATGATCTCAC
MDK4		22.07	AT5G54310.1	229	115+113	MDK4F: GCAAGTAAATCTGAGAAGC MDK4R: CCTAAAACCTGAGCTGCTG
MBR17	sslp	22.21	AT5G54630- AT5G54640	181	154	MRB17F: GAGCAATGAATCTGAAG MRB17R: CGTAAATATGGACTAGTC
MBG8-14	sslp	22.29	AT5G54850- AT5G54855	104	90	MBG8-14F: GAGGAACTGAGAGTTCCATG MBG8-14R: CCTCTAGATTGTGCTTGTG
MCO15	sslp	22.39	AT5G55131- AT5G55132	117	103	MCO15F: CGAAAACCTTATGCATGAAAC MCO15R: GAAAACGTAGGAATCTCAG
JV61/62	sslp	22.53	AT5G55131- AT5G55132	205	185	JV61/62 F: CGCTTCTCTGTGCTATTCC JV61/62 R: AAATGCAAATATTGATGTGAAA
MHM17	sslp	23.1	At5g57050	125	107	MHM17F: CTTTCTCTGTCTAGTGG MHM17R: CAGATGATCTTTTACTTCC
K19B1	sslp	25	At5g64240	160	141	K19B1F: ATGGTTGGAGAAGAAATG K19B1R: AGTCAATGTTGGGAATTTG

11. Genotipado de líneas mutantes de inserción de T-DNA

La identificación de líneas homocigotas para la inserción de T-DNA en los mutantes *mtv1-2*, *mtv4-2*, *mtv3-2* y *pten2b-2* se llevó a cabo mediante PCR con cebadores flanqueantes a la inserción y con un oligonucleótido (LB643) específico de la secuencia de T-DNA. La información referente a las líneas de inserción para los genes *MTV1* y *MTV4/AGD5* y los cebadores utilizados en las reacciones de PCR se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Información de las diferentes líneas de inserción de DNA-T utilizadas y los cebadores usados para identificar las inserciones.

Locus	Gen	Línea de Inserción	Localización de la inserción	Cebadores	Secuencia de los cebadores
At3g16270	MTV1	Salk_061811	1er exón	Salk_061811-R Salk_061811-L	CTGCTGCCATTCTCATTCTTC CAATTTCTCCGTTCTCTGCTG
AT5G54310	MTV4 AGD5	SALK_079928/NEV-7	1er exón	SALK_079928 -F SALK_079928-R	CTTGGATCCCTGTGTTC TCGTTCTCAAAGGGCA
AT3G19420	MTV3 PTEN2A	SALK_1147721C	1er exón	SALK_1147721C-F SALK_1147721C-R	TTCCCCAATCTAAAAATGTATCTC CTTGTGTTGAGTTTCAAGA
AT3G50110	PTEN2B	SALK_1200020C	1er exón	SALK_1200020C-F SALK_1200020C-R LB-salk ó Lb643	ATGGAAACTGATCCTGCTAACT GTCATGTCCAAATCGAATTCC GCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG

12. Electroforesis y purificación de fragmentos en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de concentraciones entre 1-3.5% sumergidos en tampón 1xTBE con BrEt 0.5µg/ml. Los fragmentos de ADN se separaban por electroforesis en geles de agarosa. los fragmentos con el tamaño deseado se purificaban o por el procedimiento de "freeze and squeeze" (congelar y presionar) o utilizando el kit comercial "QIAEX II Gel extracción kit" (Qiagen),.

13. Clonaje de construcciones:

- Las secuencias codificantes completas con el codón de parada de *MTV3*, *MTV3_{G167R}*, *PTEN2B* (cDNA C105193 Tair) y *AGD5* (cDNA U25083 Tair) fueron amplificadas con el enzima *Expand High Fidelity polymerase* empleando cebadores compatibles con el sistema de clonaje por recombinación Gateway (ver Tabla 5). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pDONR207 usando el kit *Gateway BP II* (Invitrogen) y se verificaron por secuenciación.
- Las secuencias genómicas que correspondían a los genes *MTV1*, *MTV3*, *MTV3-1* y *AGD5* fueron amplificadas, excluyendo el codón stop con la enzima *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* (F-548S, FINNZYMES), con cebadores compatibles con el sistema de clonaje por recombinación Gateway (ver Tabla 6). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pDONR207 usando el kit *Gateway BP II* (Invitrogen) y se verificaron por secuenciación.
- Las secuencias codificantes de *MTV1* completa, la secuencia de la región que contiene el dominio de ENTH (aminoácidos 1 a 134), o la secuencia de la región C-terminal (aminoácidos 135 a 699) fueron amplificadas con el enzima *Expand High Fidelity polymerase* empleando cebadores compatibles con el sistema de clonaje por recombinación Gateway (ver Tabla 5). Los productos de PCR fueron clonados en el

MATERIALES Y MÉTODOS

vector pDONR221 usando el kit *Gateway BP II* (Invitrogen) y se verificaron por secuenciación.

- Para generar plantas transgénicas *MTV1*, *MTV3*, *MTV3-1*, *PTEN2B* y *AGD5* fueron subclonados en los vectores pUbi-N-RFP; además, *PTEN2B* también fue subclonado en pUbi-N-GFP, las secuencias genómicas de *MTV1*, *MTV3*, *MTV3-1* y *AGD5* fueron transferidos al vector pGWB03 y pGWB04, (ver Tabla 6 para mayor detalle).
- Para expresar las proteínas en bacteria las secuencias *MTV1*, *ENTH*, *C-terminal*, *MTV3* y *MTV3-1* fueron subclonadas en una versión modificada del vector pGEX-2Tgw (GE-Healthcare) para producir GST-MTV1, GST-ENTH, y GST-C-terminal, GST-MTV3, GST-MTV3-1.
- Para generar las construcciones que codificaban fusiones de AGD5 con TAP, se subclonó en los vectores pKNTAP y pKCTAP para producir TAP-AGD5 y AGD5-TAP bajo el control del promotor 35S (Van Leene et al., 2007).

Tabla 5. Construcciones realizadas para la obtención de plantas transgénicas y expresión en bacteria. Se indica la secuencia de origen del fragmento amplificado y el vector utilizado en cada caso.

Nombre	origen	Cebadores	Vector	Construcción	Expresión en:
GST-MTV1	ADNc	MTV1 CDS GW-F MTV1 CDS GW-R stop	pGEX T2gw pUbi N-RFP	GST-MTV1	Bacteria
GST-ENTH	ADNc	MTV1 CDS GW-F MTV1 ENTH GW-R	pGEX T2gw	GST-MTV1-ENTH (1-134 aa)	Bacteria
GST-C-terminal	ADNc	MTV1 C-TERM GW-F MTV1 CDS GW-R stop	pGEX T2gw	GST-MTV1 C-Terminal (135-699aa)	Bacteria
RFP-MTV1	ADNc	MTV1 CDS GW-F MTV1 CDS GW-R stop	pUbi N-RFP	pUbi::RFP-MTV1	Planta
MTV1 GUS	genómico	MTV1 PR 0.5 GW-F	pGWB03	prMTV1::MTV1:GUS	Planta
MTV1 GFP	genómico	MTV1 CDS GW-R nonstop	pGWB04	prMTV1:MTV1:GFP	Planta
TAP-AGD5	ADNc	AGD5 CDS GW-F Kozak AGD5 CDS GW-R stop	pKNTAP	pK::TAP-AGD5	planta
AGD5 -TAP	ADNc	AGD5 CDS GW-F Kozak AGD5 CDS GW-R nonstop	pKCTAP	pK::AGD5-TAP	planta
RFP-AGD5	ADNc U25083	AGD5 CDS GW-F AGD5 CDS GW-R stop	pUbi N-RFP	pUbi::RFP-MTV4	Planta
AGD5-GUS	genómico	AGD5 PR 1.5 GW-F	pGWB03	prAGD5::AGD5:GUS	Planta
AGD5 GFP	genómico	AGD5 CDS GW-R nonstop	pGWB04	prAGD5:AGD5:GFP	Planta
MTV3 GUS	genómico	MTV3 PR 1.5 GW-F	GWB3	prMTV3::MTV3:GUS	Planta
MTV3 GFP	genómico	MTV3 PR 1.5 GW-R	GWB3	prMTV3::MTV3:GFP	Planta
MTV3-1 GFP	genómico	MTV3 PR 1.5 GW-F MTV3 PR 1.5 GW-R	GWB3	pMTV3::MTV3-1:GFP	Planta
RFP MTV3	ADNc	MTV3 CDS GW-F	pUbi N-RFP	pUB::RFP-MTV3	Planta
GST-MTV3	ADNc	MTV3 CDS GW-R stop	pGEX T2gw	GST-MTV3	Bacteria
RFP MTV3-1	ADNc	MTV3 CDS GW-F	pUbi N-RFP	pUB::RFP-MTV3-1	Planta
GST MTV3-1	ADNc	MTV3 CDS GW-R stop	pGEX T2gw	GST-MTV3-1	Bacteria
PTEN2B	ADNc C105193	PTEN2B CDS GW-F PTEN2B CDS GW-R stop	pUbi N-GFP pUbi N-RFP	pUB::GFP-PTEN2B pUB::RFP-PTEN2B	Planta Planta

14. Sistema Gateway de clonación:

- La tecnología Gateway permite la clonación de fragmentos de ADN, mediante la combinación homóloga en vectores preparados específicamente para ello. Siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen), los fragmentos de interés se amplificaron mediante PCR usando los cebadores seleccionados, a los que se les añaden los

MATERIALES Y MÉTODOS

extremos attB1 (5'-GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN—(secuencia específica)-3') y attB2 (5'-GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-AGC-TGG-GTN—(secuencia específica)-3'), que proporcionan al fragmento amplificado los sitios de recombinación attB. Los fragmentos amplificados se introdujeron, utilizando la closana BP, el vector de entrada pDONR201 o pDONR207 o pDONR221, (ver Tabla 6).

- Los fragmentos en los vectores de entrada son transferidos a distintos vectores de destino, mediante la clonasa LR. En la Tabla 7 se puede ver información detallada de los fragmentos amplificados y los cebadores utilizados en cada caso.

Tabla 6. Lista de cebadores utilizados en la amplificación de los fragmentos clonados por la tecnología Gateway.

Cebadores	Dirección/Posición	Secuencia
MTV1 PR 0.5 GW-F	En sentido/ 0.5 kb aguas arriba del codón de inicio de MTV1	ggGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgtTTGTCCCTGTTTGTACTG
MTV1 CDS GW-R nonstop	En Antisentido/ excluye el codón stop de MTV1	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgAGATACTCTTTGTGTCGCG
MTV1 CDS GW-F	En sentido/inicio de la traducción de MTV1	ggGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgtATGGATACGAGCAGGAGAGC
MTV1 CDS GW-R stop	En Antisentido/ incluye el codón stop de MTV1	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgTCAAGATACTCTTTGTGTC
MTV1 ENTH GW-R	En antisentido/para amplificar el dominio ENTH de MTV1	ggGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcATTCTCTCTGAGAATATAGC
MTV1 C-TERM GW-F	En sentido/ amplificar la región C-terminal de MTV1	ggGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcatgGGTACTAAACCAGCTGC
AGD5 PR 1.5 GW-F	En sentido/ 1.5 kb aguas arriba del codón de inicio de AGD5	ggGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTctGCAAGAGAATCAATAAGAAAG
AGD5 CDS GW-R nonstop	En Antisentido/ excluye el codón stop de AGD5	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcATGTTTTGTGAACATTCATC
AGD5 CDS GW-F	En sentido/inicio de la traducción de AGD5	ggGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcATGAACGAGAAAGCCAACGTC
AGD5 CDS GW-R stop	En Antisentido/ incluye el codón stop de AGD5	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTCAATGTTTTGTGAACATTC
AGD5 CDS GW-F Kozak	En sentido/inicio de la traducción de AGD5+ Kozak (para TAP-Tag)	ggGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTccaccATGAACGAGAAAGCCAACG
MTV3 PR 1.5 GW-F	En sentido/ 1.5 kb aguas arriba del codon de inicio de MTV3	ggGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcCCATTTTTTGTCTCTTAAC
MTV3 PR 1.5 GW-R	En antisentido/ incluye el codón de inicio de MTV3	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcCGACATCGTTTCTATCTTAATC
MTV3 CDS GW-R nonstop	En Antisentido/ excluye el codón stop de MTV3 y MTV3-1	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcATCGCTTCAAAGTCGTCTTCATC
MTV3 CDS GW-F	En sentido/inicio de la traducción de MTV3 y MTV3-1	ggGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcATGTCGTCTGAGTCAACCGA
MTV3 CDS GW-R stop	En Antisentido/ incluye el codón stop de MTV3 y MTV3-1	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTCAATCGCTTCAAAGTCGTCTTCA
PTEN2B CDS GW-F	En sentido/inicio de la traducción de PTEN2B	ggGGAAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcATGGAAATGATCCTCGCTA
PTEN2B CDS GW-R stop	En Antisentido/ incluye el codón stop de PTEN2B	ggGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTCAGTCGCTTCATAGTCT

15. Obtención de ARN

Para la extracción de ARN, se siguió el procedimiento descrito por Logemann y col. (1987). El tejido congelado en nitrógeno líquido se homogeneizó en frío hasta que se formó un polvo fino, se añadieron 400 µL de tampón Z6 (8 M cloruro de guanidinio, 20 mM MES, 20 mM EDTA, pH 7) y se continuó la homogeneización hasta la disgregación completa del tejido. Después, se añadieron 300 µL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1; v/v/v) y se agitó vigorosamente. Seguidamente, se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 16.000 g y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se añadió 0.1 volumen de ácido acético 1 M y 1 volumen de etanol al 96%, se mezcló bien y se dejó precipitando a -20° C al menos 30 minutos. Tras la precipitación, se centrifugó 20 minutos a temperatura ambiente a 16.000 g, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%. Finalmente, se dejó que se evaporase el exceso de etanol y se resuspendió el precipitado en 50 µL de agua ultra pura tratada con DEPC. El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría a una

absorbancia de 260 nm. Para los experimentos de RT-PCR, la extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

16. Hibridación tipo northern

Para la detección de moléculas específicas de ARN mediante hibridación de tipo northern, se realizaron electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,5% en presencia de formaldehído/formamida en tampón 1X MEN (10X MEN: 200 mM MOPS, 50 mM acetato sódico, 20 mM EDTA, pH 7,0; Logemann y col., 1987). Las muestras de ARN se cargaron con bromuro de etidio con el fin de visualizarlas por fluorescencia y así comprobar su integridad. Posteriormente, el ARN se transfirió a membranas de nylon Hybond XL (Amersham) por métodos convencionales (Sambrook y col., 1989). Las membranas se fijaron en un horno crosslinker UV de Amersham. Los filtros se hibridaron a una temperatura de 65°C con una sonda radiactiva (Rediprime, Amersham) en tampón fosfato 0,5 M pH 7,0, EDTA 1 mM pH 8 y SDS al 7%. Los lavados se realizaron a una temperatura de 65°C en 3X SSC con SDS 0,5% (1X SSC: NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM).

17. Transcripción reversa (RT)

Para la transcripción reversa, se partió de 1 µg de ARN total por cada muestra que fue previamente tratada con DNAasa. Se utilizó el método de “SuperScript II RT” (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El cDNA sintetizado se utilizó como molde para su amplificación mediante PCR

18. Análisis de proteínas

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de ECL-nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Inc.) e incubadas posteriormente con los anticuerpos para cada una de las proteínas diana. Se utilizó un anticuerpo conjugado con peroxidasa para detectar las proteínas reconocidas por los anticuerpos primarios por quimio-luminescencia (Amersham Biosciences, Inc.). Las proteínas de la semilla fueron extraídas y analizadas según lo descrito (Zouhar et al., 2010). El aislamiento y el análisis del líquido extracelular y el fraccionamiento de microsomas en gradientes de sacarosa se realizaron según métodos descritos (Sanmartín et al., 2007; Ahmed et al., 1997).

19. Expresión y purificación de proteína de bacteria

La expresión y purificación de las proteínas recombinantes se hizo de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante (Sistema de purificación pGEX-2T, GE-Healthcare). Brevemente: 200 ml de cultivo de *E. coli* BL-21 transformada con vectores de expresión se creció hasta una OD = 1 ($\lambda = 600 \text{ nm}$; $3 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$) fueron inducidos con IPTG 0,1 mM durante un tiempo empíricamente determinado para cada construcción (normalmente 5 h). Los cultivos inducidos se centrifugaron y las bacterias se diluyeron en tampón de ruptura 100 mM Tris pH 7,4, NaCl 200mM, EDTA 1mM, glicerol 10% y PMSF 1mM y se sonicaron (5 x 15 segundos) hasta conseguir una mezcla homogénea. Se centrifugó a 12.000 g durante 25 minutos y el sobrenadante se incubó 2h a 4⁰C en un rotor giratorio con 600 μL de resina GST (Sigma-Aldrich G4510) previamente preparada en una columna (Poly-Pre Chromatography Column, Bio-Rad, www.bio-rad.com) y acondicionada con tampón de ruptura sin PMSF. Finalizada la incubación se dejó eluir el sobrenadante y se realizaron varios lavados con tampón de ruptura (3-5). Las resinas unidas a GST-MTV1, GST-ENTH y GST-C se usaron en ensayos de Pull-Down. Las proteínas GST-MTV3 y GST- *MTV3-1* fueron eluidas con 0.5 mL de tampón 50 mM Tris-HCl, pH 9.5 con 10mM de glutatión y almacenadas a -80⁰C hasta su uso (sigma-Aldrich G4251).

20. Experimentos de "Pull-Down"

Las proteínas de fusión GST-MTV1, MTV1-ENTH y MTV1-C-terminal se generaron como se describió en el párrafo anterior. Las plántulas de *Arabidopsis* silvestres se maceraron en nitrógeno líquido y se homogenizaron en tampón de extracción (Tris-HCl pH 7.4 50 mM , NaCl 80 mM , glicerol 10%, Tween 20 0.1%, dithiothreitol 1 mM, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 1 mM, MG132 (Sigma) 50 μM e inhibidor completo de proteasas (Roche). Se centrifugó el extracto 10 minutos a 16.000 g y 4⁰C y se recuperó el sobrenadante que se usó en las incubaciones siguientes. 6 μg de cada una de las proteínas unidas a resinas de GST se incubaron con 1 mg de extracto total de proteína durante 1h a 4⁰C con rotación. Después de tres lavados con Tris-HCl pH 7.4 50 mM , NaCl 80 mM , glicerol 10%, Tween 20 0.1%, dithiothreitol 1 mM, MG132 (Sigma) 50 μM e inhibidor completo de proteasas (Roche), las proteínas unidas a la resina fueron eluidas por desnaturalización en tampón de carga SDS 1x (50 mM Tris pH 6.8, 2.2 % SDS, 10 % glicerol, 0.3 mM β -mercaptoetanol) y analizadas por ensayo western blot con anticuerpos frente a GST y frente a la cadena pesada de clatrina (CHC).

21. Purificación en tándem de complejos proteínicos, “TAP-tagging”

Las construcciones TAP-AGD5 y AGD5-TAP fueron utilizadas para transformar cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* a través del co-cultivo con *agrobacterium*. La purificación en tándem de los complejos proteínicos a partir de los cultivos celulares se hizo usando el epítipo de GS seguido de la precipitación y separación de las proteínas (Van Leene et al. 2010). Los protocolos usados para la proteólisis y aislamiento de péptidos, adquisición de los espectros de masas por el 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) y la identificación de proteínas basada en homología de MS en bases de datos del TAIR se han descrito (Van Leene et al., 2010).

22. Ensayo Lípid-strip

Para la determinación de unión de la proteína a lípidos se siguieron las indicaciones de la casa comercial, se utilizaron las membranas PIP Strip™ P-6001 de Echelon Biosciences Inc.

23. Tinción histoquímica: detección de actividad β-glucuronidasa (GUS)

Para la tinción GUS se emplearon plántulas de 6 días y plantas de 4 semanas de edad de líneas transgénicas independientes T2. Las muestras se incubaron a 37°C durante 12 h en la siguiente solución: tampón fosfato (pH 7) 50 mM, Triton 0,1 % (v/v) (Sigma), X-Gluc 2 mM (Glycosynth), K-ferrocyanide 1 mM (Sigma), K-ferricyanide 1 mM (Sigma). Después de la tinción, se hicieron varios pases en etanol al 75% y las muestras se mantuvieron en glicerol al 5% hasta ser fotografiadas. En el caso de las raíces se aplicó un protocolo adicional de desteñido con el fin de mejorar la visualización de las capas celulares. Las plántulas fueron incubadas sucesivamente en dos soluciones, primero y durante 15 min a 57°C en HCl 0,24 N, metanol 20% y después a lo largo durante 15 min a temperatura ambiente en una solución de NaOH 7%, etanol 60%. El tejido fue rehidratado mediante lavados sucesivos en series de etanol y finalmente se le aplicó vacío en presencia de una solución de etanol al 5% en glicerol al 25% para darle volumen a los tejidos.

23. Ensayos de autofagia

La clorofila se midió según el método de Arnon La concentración de clorofila A y B se determinó mediante la medición con un espectrofotómetro Beckman de los extractos de clorofila en acetona al 80% a 663 nm y 645 nm. Para calcular la concentración de clorofila A y B y establecer su relación y para evaluar la pureza de las regiones de las distintas membranas tilacoidales, se utilizaron las fórmulas descritas por McKinney (1941).

24. Microscopía confocal

Las muestras de raíces, hojas y embriones fueron examinados usando el microscopio confocal laser Leica DRM TCS SP5 AOBS. Las estructuras subcelulares fueron visualizadas usando el objetivo de agua 63x. Las proteínas reporteras fueron detectadas en sus picos de excitación máximos (nm)/emission(nm) GFP (488/496-532); RFP (591/570-630) y YFP (514/525-559) en modo secuencial para evitar el cruce de señal entre canales. Para la visualización de los embriones, se abrió la cáscara de la semilla por abrasión y se separó a los embriones por presión mecánica; en todos los casos se embebió la muestra en una solución de sacarosa 1%.

25. Tratamientos

Las plántulas de las líneas transgénicas de 4 a 5 días, que expresaban las proteínas fusionadas con proteínas reporteras fluorescentes, se incubaron en 1 ml de medio del MS líquido 0.5× con 1% sacarosa en placas de 24 pocillos del microwell en agitación lenta. Las concentraciones de los compuestos químicos utilizadas fueron: BFA 50 μ M, por un periodo de tiempo de entre 30 minutos y 2 h; la wortmannina de 30 μ M para 1h y FM4-64 de 2 μ M, como una tinción previa, de 5 min en baño de hielo, lavándose después dos veces durante 1 minuto en medio líquido frío, o, para los tratamientos a largo plazo, permaneciendo 3 h en el medio de la incubación. Todas las sustancias químicas fueron disueltas en DMSO y los controles llevaron volúmenes equivalentes de DMSO.

26. Aplicaciones bioinformáticas

- TAIR, The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidops.org/>): base de datos que nos ha proporcionado información sobre el genoma de Arabidopsis.
- 4Peaks; para el análisis de secuencias.
- ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) utilizado para alineamientos de secuencias.
- BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizado para comparar tanto secuencias de nucleótidos como de aminoácidos en la base de datos de NCBI.
- DNA-T express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>): para la búsqueda de mutantes de inserción de T-DNA en los genes de interés.
- Genevestigator (<http://www.genevestigator.ethz.ch>): empleado para buscar patrones de expresión de los genes utilizados en este trabajo.
- dCAPS Finder (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>): utilizado para buscar dianas de restricción entre dos secuencias.

MATERIALES Y MÉTODOS

- (<http://www.bar.utoronto.ca/markertraker/>).

RESULTADOS

RESULTADOS**1. Búsqueda de mutantes *modificados en el transporte a vacuolas (mtv)***

Para identificar la maquinaria celular implicada en el transporte de proteínas solubles a vacuola se había diseñado en el laboratorio un rastreo genético de mutantes *modificados en el transporte a vacuolas* (mutantes *mtv*). El rastreo se basa en que mutaciones y tratamientos que interfieren con el transporte de proteínas a la vacuola pueden resultar en la secreción de las proteínas vacuolares al apoplasto (Matsuoka et al., 1995; Shimada et al., 2003). Para este rastreo se diseñó un marcador vacuolar que permitiese una fácil detección al ser secretado. Para ello se generaron plantas transgénicas estables de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler* que expresaban la proteína quimérica vacuolar VAC2 bajo el control del promotor 35S (Rojo et al., 2002). VAC2 es una fusión de la proteína CLAVATA3 (CLV3) con la señal de selección vacuolar de la lectina de cebada (*Hordeum vulgare*). CLV3 es una proteína extracelular que regula negativamente el tamaño del nicho de células madre en el meristemo apical del tallo y en los meristemos florales y que cuando se sobre expresa con el promotor 35S causa la terminación prematura de estos meristemos (Rojo et al., 2002). En cambio, la proteína VAC2 es reconocida por la maquinaria de selección vacuolar y transportada a la vacuola, donde es inactiva y no provoca ningún fenotipo en los meristemos (Rojo et al., 2002; Sanmartin et al., 2007; Sauer et al., 2013; Zouhar et al., 2010; Zouhar et al., 2009). Por tanto el rastreo de mutantes *mtv* se basa en buscar mutantes que tengan alterado el transporte de VAC2 a vacuolas y lo secreten anormalmente al apoplasto, causando la reducción del tamaño e incluso la terminación del meristemo apical de tallo y de los meristemos florales. Estudios preliminares indican que este es un sistema con un amplio rango de detección de posibles niveles de secreción, desde plantas que presentan solo algunas flores terminadas prematuramente antes de generar los órganos internos hasta plantas que consumen su meristemo apical antes de producir un tallo floral (Rojo et al., 2002; Sanmartin et al., 2007). Para el rastreo se mutagenizó con EMS una línea homocigota para VAC2 (línea L1) que expresaba niveles de VAC2 próximos a la saturación del sistema de transporte a vacuola. Se mutagenizaron 50000 semillas M1 de la línea L1 y se distribuyeron en 48 bandejas que se recogieron independientemente, dando lugar a 48 familias de semillas M2. En un rastreo de estas familias M₂ identificamos 3 mutantes *mtv* de familias independientes que denominamos *mtv1-1*, *mtv3-1* y *mtv4-1*. Los mutantes *mtv1-1*, *mtv3-1* y *mtv4-1* presentan crecimiento determinado del meristemo apical de tallo (Figura 3) y terminación prematura de los meristemos florales en la mayoría de los casos previa a la producción de carpelos. Para comprobar que los fenotipos de meristemo terminado eran

RESULTADOS

dependientes de la presencia de VAC2, se analizaron plantas segregantes de la F2 del cruce con Col-0, comprobando que el fenotipo de meristemo terminado siempre era dependiente de la presencia del transgén VAC2, lo que demuestra que se deben a la secreción de VAC2 y no a una actividad directa de *MTV1*, *MTV3* y *MTV4* sobre el meristemo. Las mutaciones *mtv1-1* y *mtv4-1* se comportaban como mutaciones recesivas en cuanto al fenotipo *mtv*, mientras que *mtv3-1* era codominante.

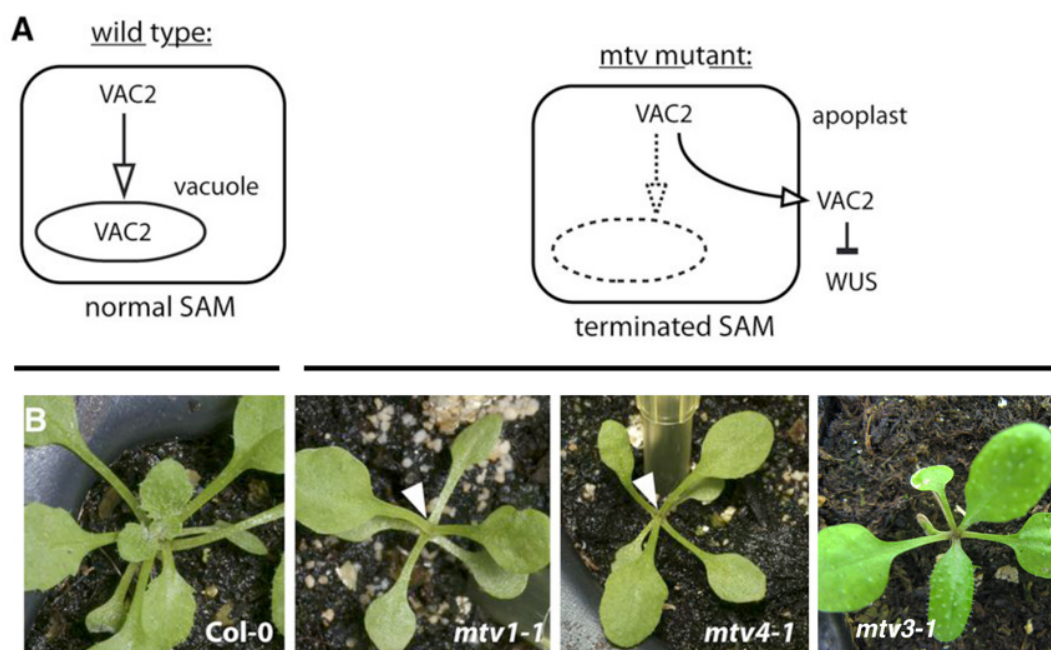


Figura 3. Identificación de los mutantes *mtv1*, *mtv3* y *mtv4*. A) Esquema del rastreo de mutantes *mtv* que secreten el marcador VAC2 y repriman al gen *wuschel*, provocando la terminación del meristemo apical de tallo (SAM). B) Fenotipo de terminación del meristemo apical de tallo en los mutantes *mtv1-1*, *mtv3-1* y *mtv4-1*.

2. Cartografiado posicional de las mutaciones *mtv1-1*, *mtv3-1* y *mtv4-1*

Las posiciones de las mutaciones *mtv1-1*, *mtv3-1* y *mtv4-1* se determinaron por cartografiado génico con marcadores SSLP y CAPS polimórficos entre los ecotipos Ler y Col-0. En el caso de las mutaciones recesivas *mtv1-1* y *mtv4-1* se seleccionaron para su análisis plantas con fenotipo *mtv* de las poblaciones F2 resultantes del cruce de los mutantes (en fondo Ler) con Col-0. En el caso de *mtv3-1* que era codominante, se distinguían dos clases de fenotipos *mtv* en la F2: plantas con un fenotipo extremo que apenas producían flores y que en su mayor parte no contenían carpelos y otras con un fenotipo intermedio que producían bastantes flores con carpelos antes de que se consumiera el meristemo. La segunda clase

RESULTADOS

correspondía a plantas heterocigotas para la mutación *mtv3-1*, mientras que la primera clase correspondía a las plantas homocigotas *mtv3-1* y fueron usadas para el cartografiado. En una primera ronda se determinó la posición cromosómica aproximada de las tres mutaciones mediante análisis en grupo ("bulk segregant analysis") para después buscar recombinantes individuales en la región de la mutación y acotar a alta resolución las mutaciones.

En el caso de *mtv1-1* se delimitó la mutación a una región del cromosoma 3 que contenía 24 genes, entre los loci At3g16180 y At3g16410. En esta región el único gen del que se podía predecir una función en tráfico vesicular era At3g16270. At3g16270 codifica para una proteína con un dominio ENTH ("EPSIN N-terminal Homology") que une a fosfoinosítidos y está presente en proteínas implicadas en deformación de la membrana para la generación de vesículas. La secuenciación de At3g16270 reveló que el mutante *mtv1-1* contenía una mutación sin sentido que introduce un codón de parada temprano en lugar del triptófano en posición 12. La proteína completa tiene 690 amino ácidos por lo que esta mutación constituiría un alelo nulo del gen. La pérdida de función concuerda con que la mutación sea recesiva e indica que la función de *MTV1* es necesaria para el correcto transporte de VAC2 a la vacuola.

La mutación *mtv3-1* fue acotada a una región del cromosoma 3 que contenía 28 genes, entre los loci At3g19340 y At3g19530. En esta región el único gen candidato a participar en tráfico vesicular era *At3g19420/PTEN2a*, que codifica para una fosfatasa de fosfoinosítidos. La secuenciación de At3g19420 reveló que el mutante *mtv3-1* contiene una mutación que provoca un cambio de amino ácido en la posición 167 (G167R). Esta glicina está conservada en el parálogo de *Arabidopsis* PTEN2b y en homólogo de humanos HsPTEN, sugiriendo que es una posición importante para la función del gen.

La mutación *mtv4-1* fue acotada a una región del cromosoma 5 que contenía 59 genes, entre los loci At5g54160 y At5g54630. En esa región se encuentra el gen *At5g54310/AGD5* que codifica para una proteína de la familia ARF-GAP implicadas en formación de vesículas. La secuenciación de At5g54310 genes reveló una mutación sin sentido que introducía un codón de parada prematuro en la posición del triptófano 76. La proteína completa tiene 464 amino ácidos por lo que esta mutación constituiría un alelo nulo del gen. La pérdida de función concuerda con que la mutación *mtv4-1* sea recesiva e indica que la función de *MTV4* es necesaria para el correcto transporte de VAC2 a la vacuola. *AGD5* fue identificado como el gen *NEVERSHED (NEV)* responsable del fenotipo de falta de abscisión de órganos florales del mutante *nevershed* (Liljegren et al., 2009). De hecho, las plantas mutantes *mtv4-1* exhiben

RESULTADOS

defectos en la abscisión de órganos florales característicos del fenotipo del mutante *nev*, mientras que los mutantes *mtv1-1* y *mtv3-1* presentan una abscisión normal de pétalos.

3. *MTV1* y *MTV4* interaccionan genéticamente en el desarrollo de la planta

Para estudiar una posible relación funcional entre *MTV1*, *MTV3* y *MTV4*, se realizaron cruces entre los mutantes respectivos. Al estar próximos en el cromosoma 3 y en repulsión en el cruce, aún no hemos conseguido dobles mutantes *mtv1 mtv3*, por lo que no se incluye su análisis en esta tesis. En la F2 resultante de cruzar *mtv3-1* con *mtv4-1* no se encontraron plantas con un fenotipo distinto a los parentales. En esta población se aislaron dobles mutantes *mtv3-1 mtv4-1* que presentaban defectos en la abscisión de órganos similares al mutante *mtv4-1* y un desarrollo similar a los mutantes *mtv3-1* y *mtv4-1*. Después de cruzar los mutantes *mtv1-1* y *mtv4-1*, se observó en la F2 la presencia de plantas con un fenotipo nuevo, que presentaban defectos severos en el desarrollo (Figura 4A) y se correspondían con los dobles mutantes *mtv1-1 mtv4-1*. Las plantas *mtv1-1 mtv4-1* presentan un crecimiento reducido tanto en las raíces como en las hojas (Figura 4B). Sin embargo, a pesar de la drástica reducción del tamaño vegetativo de las plantas, su patrón de desarrollo es relativamente normal. Además, cabe destacar que en el doble mutante se observó un tamaño normal en los órganos florales (Figura 4D) y un defecto de abscisión similar al observado en el mutante *mtv4-1* (Figura 4E). La falta de aditividad observada en las flores podría deberse a la expresión de otros genes con funciones redundantes (por ejemplo, otros genes ENTH o proteínas AGD) en esos órganos. La viabilidad del polen no se vio afectada, como se demostró por la tinción vital Alexander (Figura 4C) pero las silicuas de los dobles mutantes eran más cortas y tenían menos semillas que en las plantas silvestres o en los mutantes simples, indicando que la fertilidad estaba afectada. La interacción genética indica relación funcional (Perez-Perez et al., 2009) y el efecto sinérgico de las mutaciones en el desarrollo sugiere que *MTV1* y *MTV4* convergen en un nodo de tráfico que es esencial para el crecimiento de la planta. Mientras *MTV4* es miembro de una familia multigénica, *MTV1* no parece tener parálogos en *Arabidopsis* (ver mas abajo). Sin embargo si existen otras proteínas con dominios ENTH implicadas en tráfico a vacuolas (Lee et al., 2007; Song et al., 2006) que podrían tener una función redundante con *MTV1*, por lo que no es posible asegurar si el fenotipo sinérgico de *mtv1-1 mtv4-1* es debido a la perturbación parcial en dos puntos de una misma ruta de tráfico a vacuolas o a la perturbación en dos rutas paralelas. Debido a la interacción genética demostrada, nos centramos primero en analizar funcionalmente los genes *MTV1* y *MTV4*.

RESULTADOS

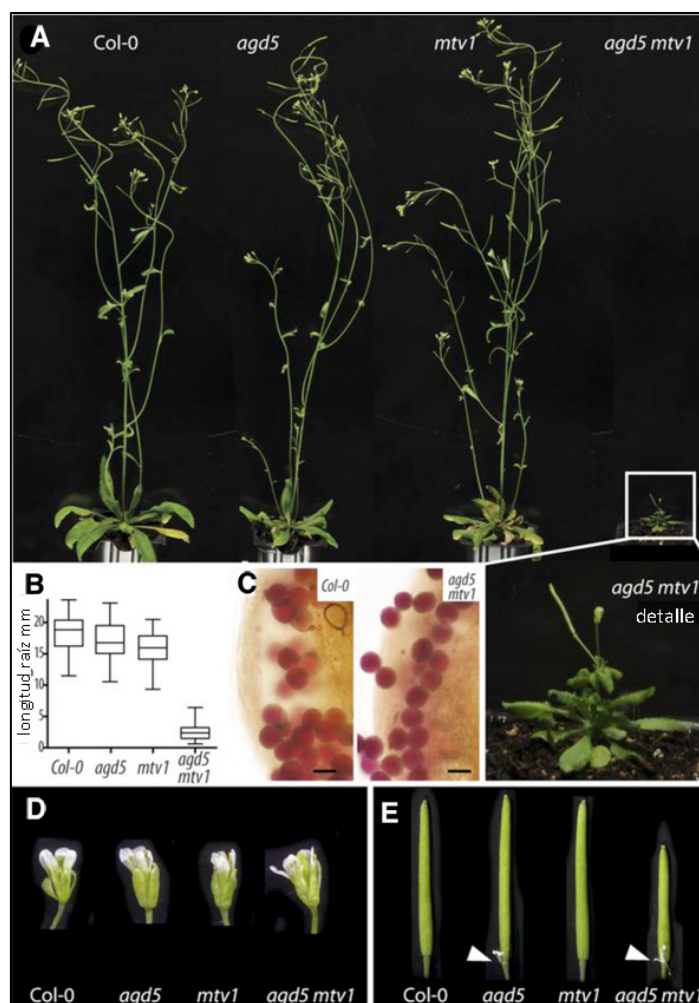


Figura 4. Caracterización del fenotipo de plantas mutantes *mtv1*, *mtv4/agd5* y *mtv4/agd5 mtv1*.

- (A) Fenotipo de las plantas de 4 semanas de tipo silvestre (Col-0), *mutantes simples mtv1* y *mtv4/agd5* y el mutante doble *mtv4/agd5 mtv1*. En la parte inferior se presenta una ampliación de la planta *agd5 mtv1* enmarcada en el cuadro blanco.
- (B) Longitud de la raíz de plántulas 5 días después de la germinación, $n > 40$ raíces. Las barras indican el rango de valores y la línea horizontal la mediana.
- (C) Tinción de Alexander que indica que la viabilidad del polen no está alterada en *agd5 mtv1*.
- (D) El tamaño de la flor no está alterado en el doble mutante *agd5 mtv1*.
- (E) Fenotipo de silículas. Las puntas de flechas indican el defecto en la abscisión de órganos florales en las plantas *agd5* y *mtv4/agd5 mtv1*. La barra de escala corresponde a 25 μm .

4. MTV1 Y MTV4 codifican para proteínas con dominios ENTH y ArfGAP, respectivamente.

Para verificar que los genes MTV1/At3g16270 y MTV4/At5g54310 causaban el fenotipo de terminación prematura de los meristemos, se cruzó la línea reportera VAC2 con los mutantes de inserción de T-DNA *mtv1-2* (Salk_061811) y *mtv4-2* (Salk_079928) que en ambos casos

RESULTADOS

presentan las inserciones dentro del primer exón de los respectivos genes (Figura 5C). En la F2 de los cruces se encontraron plantas con fenotipo *mtv* que correspondían a mutantes homocigotos para las inserciones de T-DNA y que contenían el transgén VAC2, confirmando que las mutaciones MTV1/At3g16270 y AGD5/At5g54310 causan la secreción del marcador VAC2. En ensayos de western blot no se detectó proteína MTV1 en *mtv1-1* y *mtv1-2*, ni MTV4 en *mtv4-1* y *mtv4-2* (Figura 5A-C), confirmando que se trata de alelos nulos de pérdida total de función. Para todos los demás análisis descritos en esta tesis, se han usado los alelos de T-DNA ya que en los alelos de EMS puede haber otras mutaciones ligadas a los genes que afecten a los fenotipos.

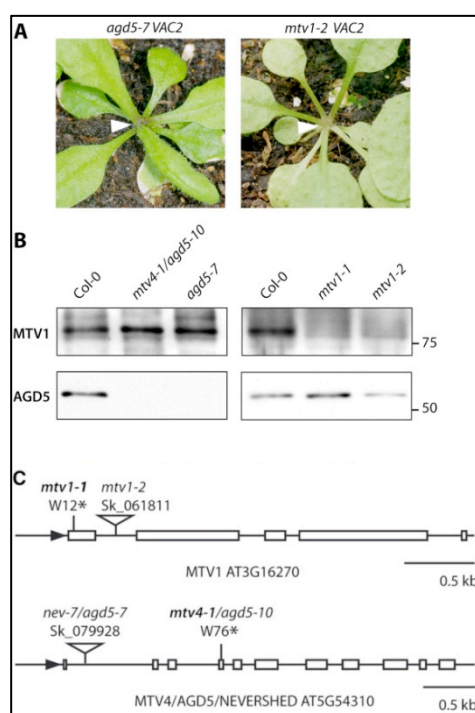


Figura 5. Los mutantes de inserción de T-DNA de MTV1 y AGD5 provocan la secreción de VAC2

- Los mutantes *mtv1-2*(salk_061811) y *mtv4-2/agd5-7* (salk_079928) presentan fenotipo *mtv* en presencia del transgén VAC2.
- Los ensayos por western blot de extractos de proteínas totales de plantas Col-0, *mtv4-1*, *mtv4-2/agd5-7*, *mtv1-1* y *mtv1-2* utilizando anticuerpos contra MTV1 y MTV4 confirman que todos los mutantes son nulos.
- Esquema gráfico que muestra la posición de la inserción de T-DNA en los genes MTV1 y MTV4/AGD5.

Los análisis de la secuencia primaria de aminoácidos predicen un dominio ENTH/VHS (InterPro code IPR008942) en el extremo amino (aminoácidos de 1 a 134) de la proteína MTV1, que además se corrobora por estudios estructurales por resonancia magnética nuclear (Lopez-Mendez et al., 2004). Análisis de WU-BLAST muestran que MTV1 no tiene ninguna similitud

RESULTADOS

significativa con otras proteínas de *Arabidopsis*, pero sí con proteínas de otras especies vegetales. La identidad de MTV1 con sus homólogos en el clado de las angiospermas está por encima del 50% (Figura 6), mientras que en *Selaginella* y *Physcomitrella* es de un 38% y un 36.8% respectivamente. En la mayoría de las especies vegetales se encontró identidad con un solo ortólogo de MTV1 (Figura 6), indicando que se encuentra principalmente como gen de copia única. Un análisis filogenético de proteínas de plantas con dominio ENTH homologas a MTV1 y a epsinas separa claramente a MTV1 de estas últimas. At3g16270 representa por tanto el único miembro de *Arabidopsis* del subgrupo MTV1 de proteínas con dominio ENTH. Además MTV1 tiene homólogos en animales, pero no en hongos. El homólogo de MTV1 en humanos es la proteína TEPSIN que ha sido recientemente descrita como una proteína asociada al complejo adaptador AP-4 (Borner et al., 2012).

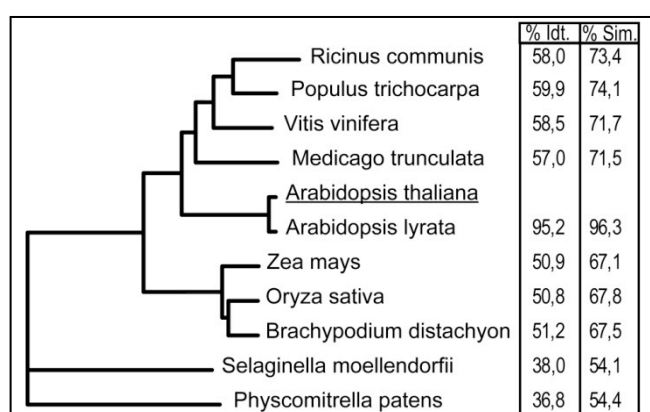


Figura 6. Análisis filogenético de MTV1. Se muestra el grado de identidad y similitud entre las proteínas MTV1 en embriofitas.

MTV4/AGD5 por el contrario pertenece a una familia de 15 proteínas de *Arabidopsis* que contienen el dominio ArfGAP (Proteínas AGD) (Vernoud et al., 2003)). AGD5 define una clase de ARF-GAPs específica de plantas, mientras que el resto de AGDs tiene homólogos fuera de las plantas (Liljegren et al., 2009; Sauer et al., 2013).

5. MTV1 y MTV4/AGD5 presentan patrones de expresión semejantes

AGD5 tiene un papel en abscisión de órganos florales, pero la secreción de VAC2 en el meristemo apical del mutante *mtv4* sugiere que AGD5 tiene funciones extendidas a otras partes de la planta. Para definir los tejidos y estados de desarrollo en los que AGD5 pudiera tener un papel, se generaron líneas transgénicas estables expresando el gen reportador de la

RESULTADOS

β -glucuronidasa bajo el control del promotor y el 5'UTR del gen AGD5 (*pAGD5:AGD5-GUS*) y se analizó su expresión en diferentes estados de desarrollo.

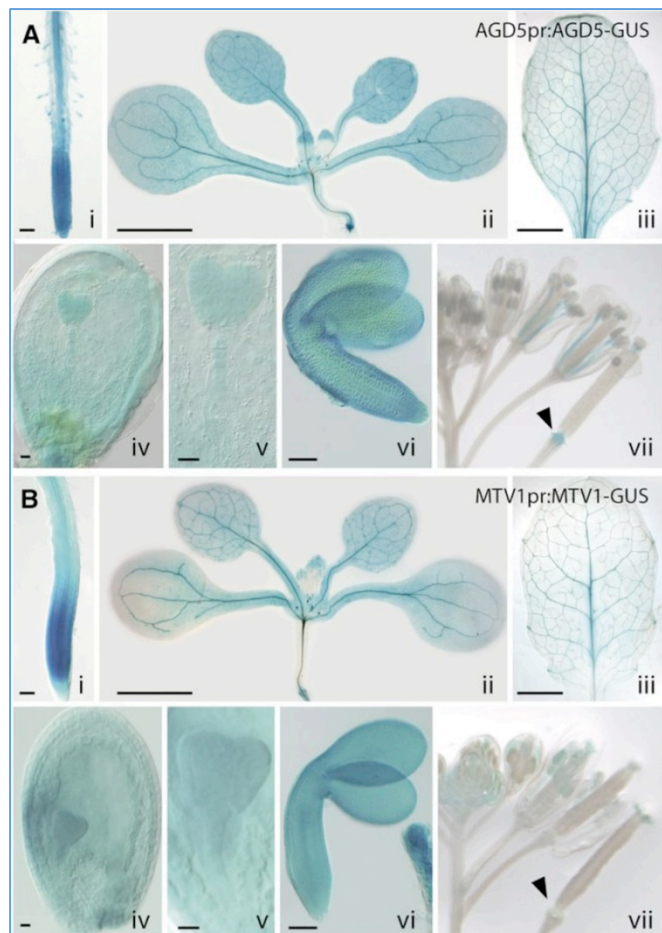


Figura 7. Análisis del patrón de expresión de los genes AGD5 y MTV1

- (A) Análisis histológico de las plantas transgénicas que expresan la construcción *prAGD5::AGD5:GUS*.
(B) Análisis histológico de las plantas transgénicas que expresan la construcción *prMTV1::MTV1:GUS*.
El número romano en la parte derecha inferior indican: i = raíz primaria, ii= planta de 11 dpg, iii= hoja de planta que ha crecido en tierra, iv= Semilla inmadura con el embrión en el estadio de corazón, v= embrión en estadio de corazón, vi= embrión maduro, vii= inflorescencia con flores en diferentes estados de desarrollo. La punta de flecha indica la zona de abscisión.
Las barras de escala corresponden a: 100 μ m en (i) y (vi), 2 cm en (ii) y (iii), 25 μ m en (iv) y (v).

La señal de GUS se detectó en la mayoría de los tejidos de la planta (Figura 7A). Se observó una señal mas fuerte en el meristemo radicular, la raíz, el tallo y los haces vasculares de la hoja, en

RESULTADOS

la zona de abscisión de órganos florales y en embriones en desarrollo y maduros (Figura 7Avii). Este patrón de expresión en semillas sería compatible con la participación de *AGD5* en el transporte de proteínas de reserva a vacuolas que tiene lugar en esos estadios embrionarios (Santos-Mendoza et al., 2008).

El gen *MTV1* no ha sido previamente caracterizado. Análisis de co-expresión en experimentos de micromatrices (ATTED-II) indican que *MTV1* se co-expresa tanto con *MTV4/AGD5* como con *MTV3*. Se generaron líneas transgénicas estables expresando el gen reportador del β -glucuronidasa bajo el control del promotor y el 5'UTR del gen *MTV1* (*pMTV1:MTV1-GUS*). Confirmando los datos de co-expresión de los transcritos, las líneas *pMTV1:MTV1-GUS* exhiben un patrón de expresión casi idéntico al de *pAGD5:AGD5-GUS* (Figura 7B), si bien hay que destacar que en la zona de abscisión floral se detectó una fuerte expresión de *AGD5* pero no de *MTV1* (Figura 7Bvii), lo cual concuerda con la función específica de *AGD5* en abscisión de estos órganos. La coincidencia en el patrón de expresión y el fenotipo sinérgico del doble mutante, sugieren que *MTV1* y *AGD5* colaboran en el transporte de proteínas a la vacuola, si bien es posible que a través de rutas paralelas.

6. *MTV1* y *AGD5* están implicados específicamente en el transporte del cargo vacuolar

El hallazgo de que *MTV1* y *MTV4* codifican las proteínas ENTH y ARF GAP sugiere que la secreción *VAC2* en los mutantes respectivos se debe a un bloqueo directo del tráfico vesicular, lo que implica que proteínas vacuolares endógenas que compartan la misma ruta de tráfico también pueden estar afectadas. Las globulinas 12S y la aleurina son proteínas vacuolares de *Arabidopsis* anormalmente secretadas en los mutantes *enhanced vti12* y *vsr1 vsr4*, que tienen fenotipo *mtv* en presencia del transgén *VAC2* (Sanmartin et al., 2007; Zouhar et al., 2010). La expresión de *MTV1* y *AGD5* en semillas y en tejidos vegetativos sería compatible con un papel en el tráfico de las globulinas 12S específicas de semillas y de la aleurina que se expresa a lo largo del desarrollo de la planta. El procesamiento proteolítico de las globulinas 12S ocurre entre el PVC y la vacuola (Otegui et al., 2006), por lo que la acumulación de precursores de globulina 12S es un indicador de que no han alcanzado estos compartimento y correlaciona normalmente con su secreción (Li et al., 2013; Shimada et al., 2003). Para probar si *MTV1* y *AGD5* están implicados en el transporte a vacuolas de las globulinas 12S, se realizó una comparación entre el perfil proteico de las semillas Col-0 y de los mutantes. En los mutantes *agd5* y *mtv1* se detectó un aumento en la acumulación del precursor de globulinas 12S, de 50-

RESULTADOS

kD, que fue más clara en el mutante doble de *mtv1 agd5* (Figura 8A) Además, el análisis por microscopía mostró que tanto los mutantes simples como el mutante doble contenían VRs mas redondeadas y pequeñas, y un mayor espacio entre ellas (Figura 8B) lo que indica que se acumulan menos proteínas en las VRs durante la embriogénesis. Estos resultados sugieren que AGD5 y MTV1 cooperan en el tráfico de las globulinas 12S a la vacuola, probablemente en una etapa anterior al procesamiento proteolítico de los precursores de globulinas 12S, que ocurre entre el PVC y la vacuola.

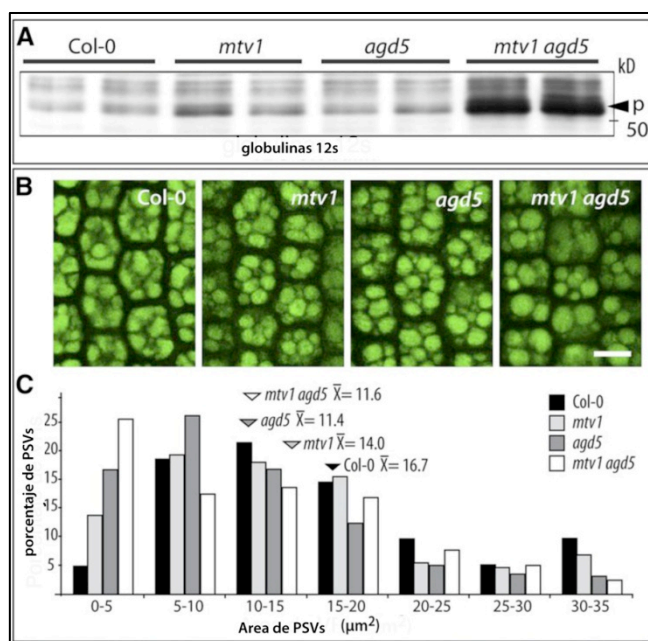


Figura 8. MTV1 y AGD5 están implicados en el transporte de proteínas vacuolares de reserva en semillas.

- (A) Determinación de la acumulación de precursores de las 12S globulinas por ensayos de western blot.
- (B) Morfología de las vacuolas de reserva en semillas de las plantas silvestres y de los mutantes.
- (C) La distribución del tamaño de las vacuolas de reserva en semillas de plantas mutantes respecto Col-0 se representa por medio de una gráfica de barras. (el número de vacuolas de reserva medidas: $n = 470$ para Col-0, $n = 566$ para *mtv1*, $n = 661$ para *agd5*, $n = 660$ para *mtv1agd5*). El tamaño medio de la vacuola de reserva (\bar{x}) de los diferentes fenotipos es mostrado por las puntas de flecha. Las vacuolas de reserva fueron significativamente más pequeñas en *mtv1* ($= 14.0 \mu\text{m}^2$, $P = 4.4 \times 10^{-5}$), *agd5* ($= 11.4 \mu\text{m}^2$, $P = 1.4 \times 10^{-16}$), y *mtv1agd5* ($= 11.6 \mu\text{m}^2$, $P = 1.6 \times 10^{-15}$) respecto a Col-0 ($= 16.7 \mu\text{m}^2$). El análisis estadístico se realizó por medio de la aplicación de la prueba t Student.

Para determinar si AGD5 y MTV1 también afectan al transporte de proteínas vacuolares en tejidos vegetativos, se analizó la secreción de la proteasa vacuolar aleuraina (Ahmed y col., 2000). Se

RESULTADOS

obtuvieron fracciones de fluido extracelular de hojas maduras de Col-0 y de los mutantes y se analizó la presencia de aleuraina con anticuerpos específicos. Además, se determinaron los niveles de actina, de la subunidad DET3 de la ATPasa vacuolar y de la proteína chaperona BiP residente en el RE como controles del nivel de contaminación con proteínas intracelulares en las fracciones extracelulares. En el fluido extracelular de plantas Col-0 y de las plantas *agd5* se encontraron pequeñas cantidades de aleuraina, actina, y DET3, mientras que los niveles de BiP eran indetectables (Figura 9A). En las plantas *mtv1* se percibió un aumento moderado de los niveles de aleuraina secretada, y en el mutante doble *mtv1 agd5* este aumento fue pronunciado. Además, se detectó la acumulación del precursor de aleuraina en las fracciones del fluido extracelular de *mtv1* y de las plantas de *mtv1 agd5*, conforme con datos anteriores que mostraban el procesamiento incompleto de aleuraina cuando se secreta en el apoplasto (Zouhar et al., 2010).

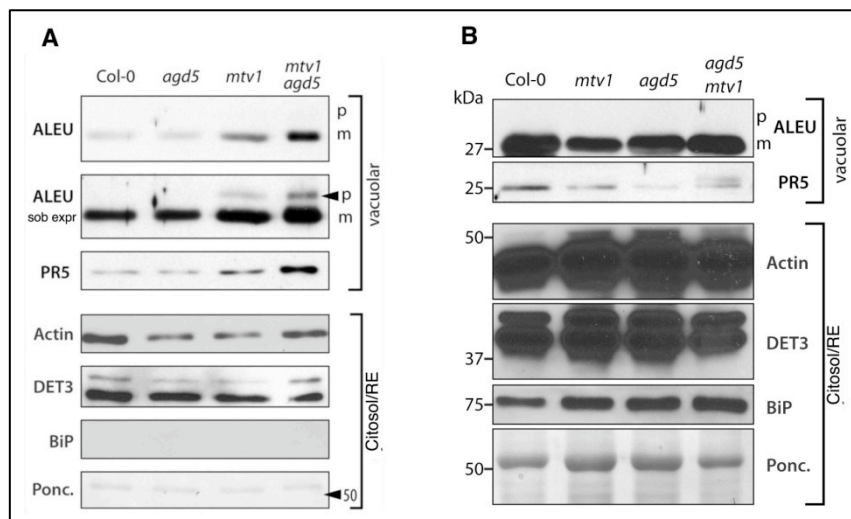


Figura 9. MTV1 y AGD5 están implicados en transporte de proteínas vacuolares endógenas en tejidos vegetativos.

- (A) Análisis de la presencia en fracciones de fluido extracelular de hojas maduras de las proteínas vacuolares ALEU y PR5 en los genotipos indicados.
- (B) Acumulación de las proteínas ALEU y PR5 en extractos totales de proteínas de los distintos genotipos.

Para obtener pruebas adicionales de la secreción anormal del cargo vacuolar en los mutantes, se analizó la presencia de PR5, que se localiza en el proteoma de la vacuola de las hojas de Arabidopsis. Como en el caso de la aleuraina, se encontró una mayor acumulación de PR5 en el

RESULTADOS

apoplasto de hojas de *mtv1* y de *mtv1 agd5*. Para descartar que el incremento de la señal en las fracciones extracelulares fuera causado por una mayor expresión de estos genes o por una mayor estabilidad de las proteínas, se compararon los extractos de proteína total del material de las mismas hojas que fueron utilizadas para la extracción del fluido extracelular. No se detectaron cambios en la expresión de las proteínas de PR5 y aleuraina en los mutantes (Figura 9B), lo que indica que la presencia de PR5 y de aleuraina en el líquido extracelular de las hojas del mutante es causada por un defecto en el transporte a vacuolas. Para explorar si las mutaciones *mtv1* y *agd5* afectan a otras rutas de tráfico, se analizó la localización de marcadores de endocitosis y de secreción en el mutante doble *mtv1 agd5*, que es el que presenta fenotipos de tráfico vacuolar más drásticos. En primer lugar, se utilizó la tinción con el compuesto lipofílico fluorescente FM 4-64 para analizar la endocitosis en el mutante. Al incubar plántulas de *Arabidopsis* con FM4-64, se tiñe primero la membrana plasmática, después el FM4-64 se internaliza vía endocitosis y llega al TGN/endosoma temprano, luego pasa por el PVC para finalmente llegar a la vacuola y teñir el tonoplasto (Dettmer et al., 2006).

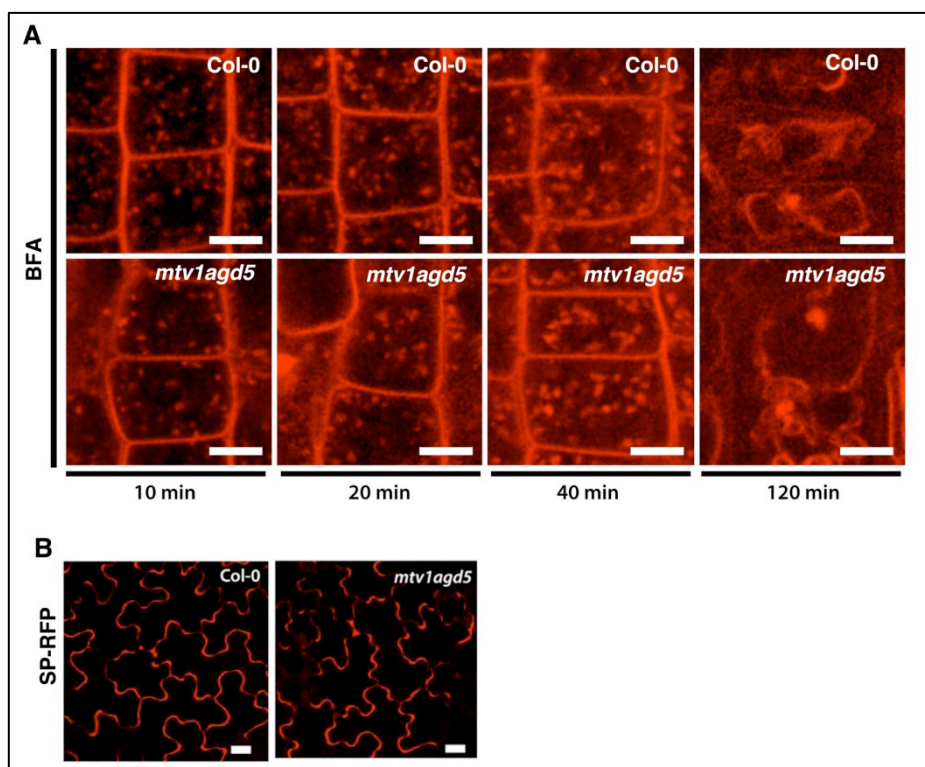


Figura 10. MTV1 y AGD5 no están implicadas en endocitosis y en la ruta secretora.

- (A) Dinámica de absorción de FM4-64, un marcador de endocitosis, en células de raíz de Col-0 y del doble mutante *mtv1agd5*.
- (B) Expresión de SP-RFP, marcador de ruta secretora, en células de cotiledones de las plantas Col-0 y *mtv1 agd5*.

Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

RESULTADOS

No se detectó ningún cambio claro en la dinámica de la absorción y del tránsito a través de los endosomas de FM4-64 en las raíces de los mutantes dobles, indicando que la ruta endocítica no estaba afectada significativamente (Figura 10A). Para confirmar estos resultados, analizamos la internalización de los transportadores de auxina PIN1 y PIN2 en raíces de plantas silvestres y en el doble mutante. Estos transportadores se internalizan constitutivamente para volver a ser dirigidos a la membrana plasmática desde endosomas de reciclaje. El tratamiento con brefeldina A (BFA) inhibe la exocitosis y, provoca la acumulación de las proteínas PIN en los cuerpos de BFA.

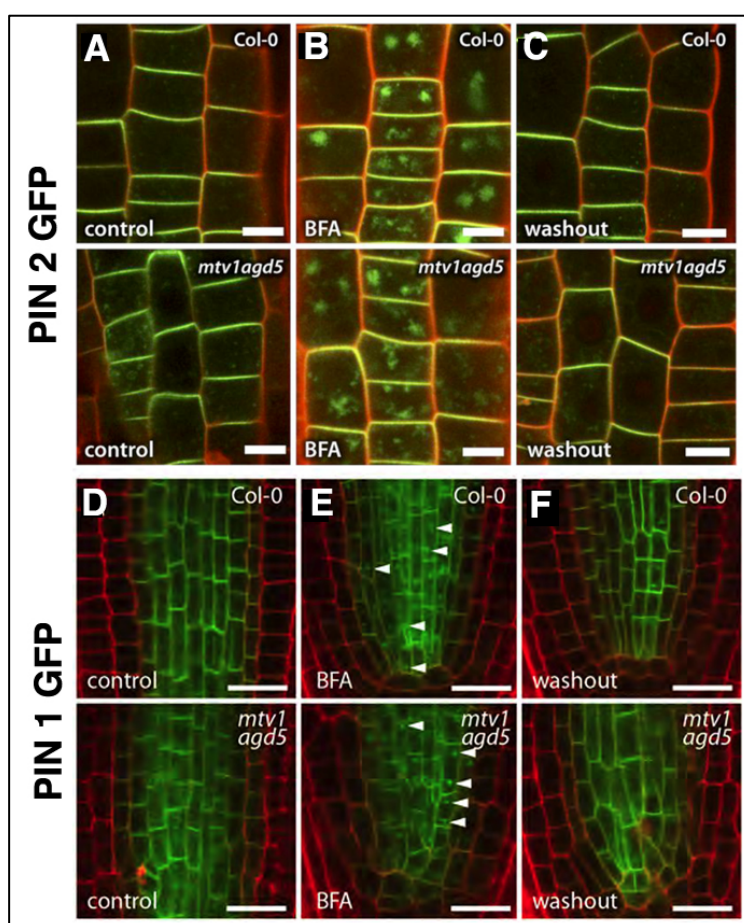


Figura 11. MTV1 y AGD5 no están implicados en el transporte de auxinas.

(A-C) y (D-F) La localización de los transportadores de auxinas PIN2-GFP y PIN1-GFP (señal verde) en las raíces de las plantas Col-0 y mutante *mtv1agd5* no presentan diferencias. Las raíces se tiñeron con ioduro de propidio (señal roja).

(B y E) Los transportadores PIN2-GFP y PIN1-GFP se localizan en los cuerpos de BFA después de una hora de tratamiento en las raíces de las plantas Col-0 y mutantes.

(C y F) No se observan diferencias en la localización de PIN2-GFP y PIN1-GFP en las raíces de las plantas Col-0 y mutantes después de dos horas de eliminar el compuesto BFA.

Las barras de escala corresponden a 10 μm en (A-C) y 30 μm en (D-F).

RESULTADOS

La inhibición de la exocitosis es reversible y al eliminar el BFA, las proteínas PIN presentes en los cuerpos BFA se redirigen a la membrana plasmática (Geldner et al., 2003; Langhans et al., 2011). Al tratar con BFA no se encontró ninguna diferencia en la acumulación de PIN1-GFP y PIN2-GFP en los cuerpos BFA entre plantas silvestres y de doble mutante (Figura 11 B y E) y tampoco se observó ningún cambio en la exocitosis una vez retirado el BFA (Figura 11 C y F), sugiriendo que AGD5 y MTV1 no desempeñan un papel en la endocitosis y exocitosis de estas proteínas en plantas. De acuerdo con esto, el doble mutante no tiene defectos aparentes en la localización polar de PIN1-GFP o de PIN2-GFP o en patrones de desarrollo dependientes de la polarización de las proteínas PIN (Figura 11 A y D). También se estudió la localización de la proteína extracelular SP-RFP (Cazador y col., 2007), y no se detectaron diferencias entre el doble mutante y la planta silvestre confirmando que la secreción no está afectada (Figura 10B). Concluimos de estos resultados que *MTV1* y *AGD5* participan específicamente en el tráfico vacuolar y por tanto su función no puede ser anterior a la divergencia con la ruta secretora que ocurre en el TGN.

7. MTV1 y AGD5 co-localizan en el TGN y redistribuyen en el borde de los cuerpos de BFA

La proteína AGD5 co-localiza con las proteínas residentes en el TGN VTI12 (Liljegren et al., 2009) y SYP61 (Stefano et al., 2010), sugiriendo que AGD5 regula la formación de vesículas en ese compartimento. Para estudiar la distribución subcelular de MTV1, se generaron plantas transgénicas estables de *Arabidopsis thaliana* con la construcción *prMTV1:MTV1-GFP* que expresan la proteína quimérica MTV1-GFP bajo el promotor de MTV1. Esta construcción complementa el mutante *mtv1*, sugiriendo que reproduce la actividad y localización del gen endógeno. Se analizó la localización de MTV1-GFP por microscopía confocal en células de raíz y se encontró la señal GFP en estructuras punteadas distribuidas ampliamente en el citosol, lo que indica que MTV1 reside en un compartimento del sistema de endomembranas. Para identificar este compartimento, se cruzaron plantas de *prMTV1:MTV1-GFP* con una colección de líneas transgénicas que expresan marcadores específicos de compartimentos del sistema de endomembranas. El marcador del LE/PVC wave2R (RabF2b/ARA7, (Geldner et al., 2009) también presenta un patrón punteado, pero no mostró co-localización significativa con MTV1 (Figura 12A).

RESULTADOS

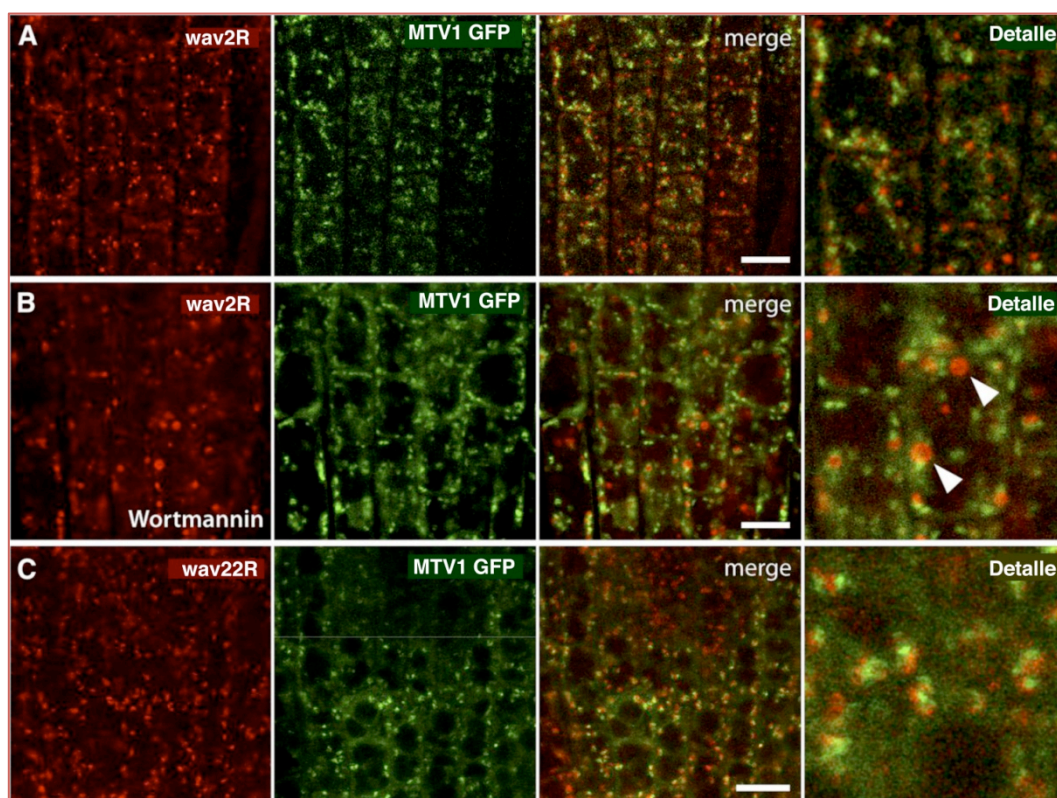


Figura 12. MTV1 y AGD5 no se localizan en el Golgi o en el PVC.

- (A) Las imágenes de confocal de MTV1-GFP (señal verde) y el marcador de PVC ARA7-RFP (wav2R, señal roja) no muestran co-localización entre ambas señales.
- (B) El tratamiento con wortmanina, un inhibidor de la PI3 quinasa, no afecta la localización de MTV1-GFP. Se puede observar en el cuadro de detalle la formación característica de estructuras en forma de anillo marcadas con ARA7-RFP (wav2R).
- (C) La señal de MTV1-GFP no co-localiza con el marcador de Golgi wav22R (SYP32-RFP).
Las barras de la escala corresponden a 20µm.

La wortmanina, un inhibidor de PI-3 quinasa, provoca un aumento del tamaño del PVC y la formación de estructuras con forma de anillo que permiten identificar inequívocamente este compartimiento (Tse et al., 2004). Al tratar nuestras líneas con wortmannina, se observó que wav2R marcaba estructuras con forma de anillo características, mientras que MTV1-GFP mantenía una señal punteada separada de wave2R (Figura 12 B), apoyando que MTV1 no está localizado en el PVC. El marcador de Golgi wave22R (SYP32) tampoco co-localizaba con MTV1-GFP, pero las dos señales estaban asociadas en gran proximidad (Figura 12 C).

RESULTADOS

Además un análisis dinámico en el tiempo mostró que MTV1-GFP co-emigra con wave 22R (Figura 13), indicando que MTV1 reside en el TGN ya que éste permanece asociado al Golgi en plantas (Viotti et al., 2010).

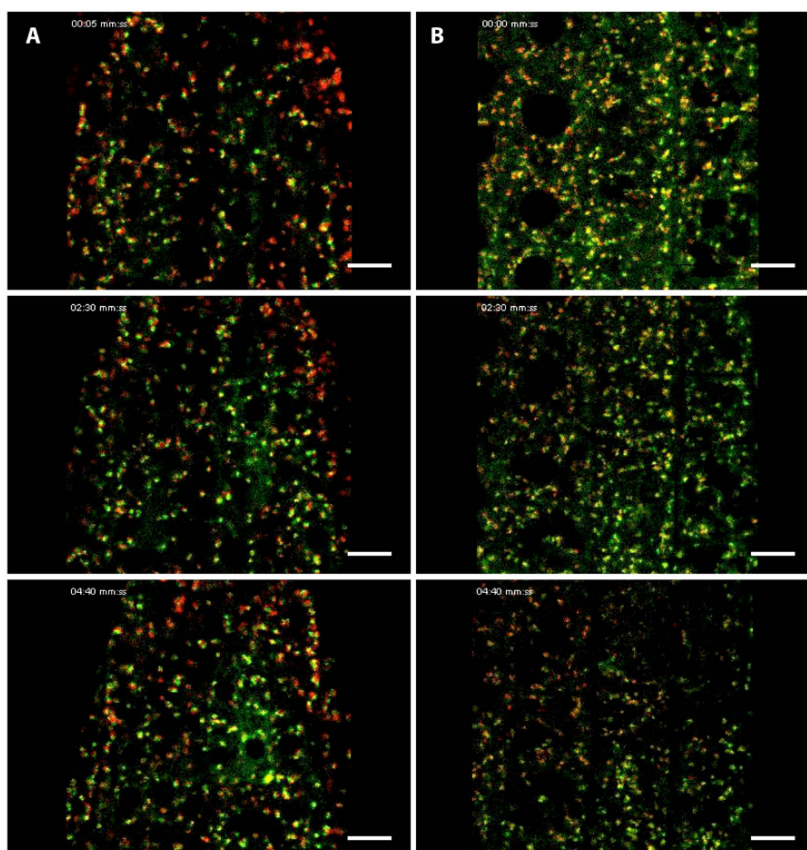


Figura 13. MTV1 se localiza en un compartimento asociado a Golgi.

- (A) Los análisis dinámicos en el tiempo de la expresión de MTV1-GFP (señal verde) y el marcador de Golgi wav22R (SYP32-R.FP), muestran que las dos señales migran conjuntamente, pero no se superponen
 - (B) Los análisis dinámicos en el tiempo de la expresión de MTV1-GFP y del marcador de TGN SY61 CFP (señal roja) muestran que ambas señales se superponen perfectamente (señal amarilla), lo que demuestra que MTV1 se localiza en TGN.
- Las barras de la escala corresponden a 20 μ m.

Efectivamente, al cruzar MTV1-GFP con los marcadores de TGN SYP61-CFP y VHA-a1-RFP (Dettmer et al., 2006; Robert et al., 2008) se comprobó un alto nivel de co-localización (Figura 14A-B) indicando que MTV1 se localiza preferentemente en el TGN. No obstante, hay una pequeña fracción de la señal MTV1 que co-emigra pero no coincide con la señal de los

RESULTADOS

marcadores de TGN, lo que podría representar una presencia parcial de MTV1 en las cisternas trans del Golgi. De acuerdo con la colocalización con marcadores de TGN, se observó una estrecha coincidencia de las señales de MTV1-GFP con FM4-64 después de periodos cortos de incubación (Figura 14C) cuando el FM 4-64 solo ha alcanzado el TGN (Dettmer et al., 2006).

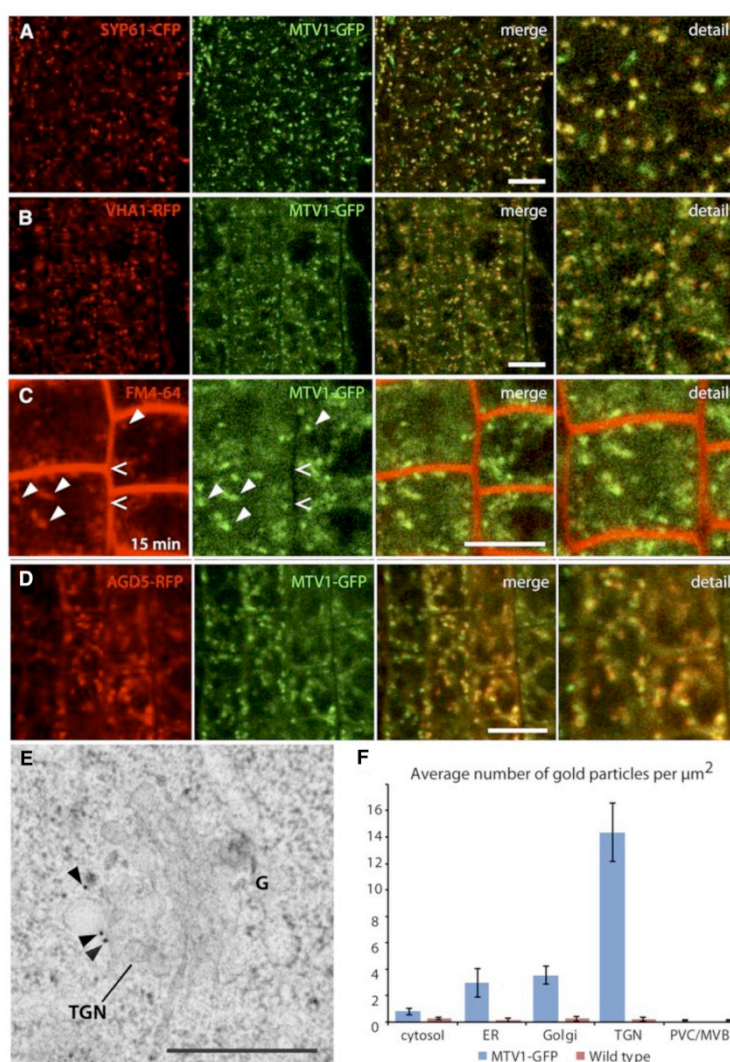


Figura 14. MTV1 y AGD5 se localizan en el TGN.

- (A) y (B) La señal de MTV1-GFP (en verde) colocaliza con las señal de los marcador de TGN SYP61-CFP (A, en rojo) y VHA1-RFP (B, en rojo).
- (C) MTV1-GFP colocaliza con el compuesto lipofílico fluorescente FM4-64 (señal roja) después de 15 minutos de tratamiento, correspondiente a la localización de FM4-64 en el TGN.
- (D) AGD5-RFP y MTV1-GFP colocalizan en el TGN. La barras de escala corresponden a 20 μm .
- (E) Inmunolocalización de MTV1 por ensayos de microscopía electrónica en raíces de las plantas MTV1-GFP, utilizando un anticuerpo primario contra GFP y un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal. Las puntas de flecha muestran la localización de MTV1-GFP en el TGN. G = Golgi. La barra corresponde a 500 nm.
- (F) Cuantificación de la densidad de partículas de oro en distintos compartimentos subcelulares en plantas MTV1-GFP. Se utilizó Col-0 como control negativo.

RESULTADOS

Para comprobar la identidad de los orgánulos donde se localiza MTV1-GFP, se realizaron ensayos de inmunolocalización por microscopía electrónica en cortes ultrafinos de raíces de plantas MTV1-GFP en colaboración con el Dr. York-Dieter Stierhof de la Universidad de Tübingen. Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo anti-GFP y se detectó con anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro. La cuantificación de las partículas de oro demostró que la mayor densidad estaba asociada al TGN (Figura 14E-F), confirmando los resultados obtenidos por microscopía confocal. En conjunto estos resultados sugieren que MTV1, al igual que AGD5, reside en el TGN, una observación que concuerda con la interacción genética y funcional de estas dos proteínas. Para comprobar su co-localización directamente, se generaron plantas transgénicas estables que expresaban la proteína de AGD5-RFP bajo el promotor de la ubiquitina 10 y se cruzaron con las plantas que expresaban *prMTV1:MTV1-GFP*. Las imágenes de microscopía confocal mostraron una estrecha coincidencia entre ambas señales, confirmando que MTV1 y AGD5 residen en el mismo compartimiento de TGN (Figura 14D).

8. MTV1, AGD5 y clatrina colocan en un dominio especial del TGN

En raíces de *Arabidopsis*, el tratamiento con BFA provoca la redistribución del TGN al centro de los cuerpos de BFA (Langhans et al., 2011). El tratamiento con BFA también produjo una redistribución de MTV1 y AGD5. Sin embargo, MTV1 y AGD5 se localizaban en la periferia de los cuerpos de BFA, separados del marcador de TGN SYP61-CFP y del FM4-64 endocitado que se encontraban en el centro de estos cuerpos (Figura 15A-B y D). El marcador de *cis-Golgi* wave22R (SYP32) también se redistribuye a la periferia de los cuerpos de BFA (Geldner et al., 2009). Sin embargo, las señales de SYP32-RFP y de MTV1-GFP en la periferia de los cuerpos de BFA son mutuamente exclusivas (Figura 15C), indicando que la localización periférica de MTV1 en el cuerpo de BFA no corresponde al *cis-Golgi*.

RESULTADOS

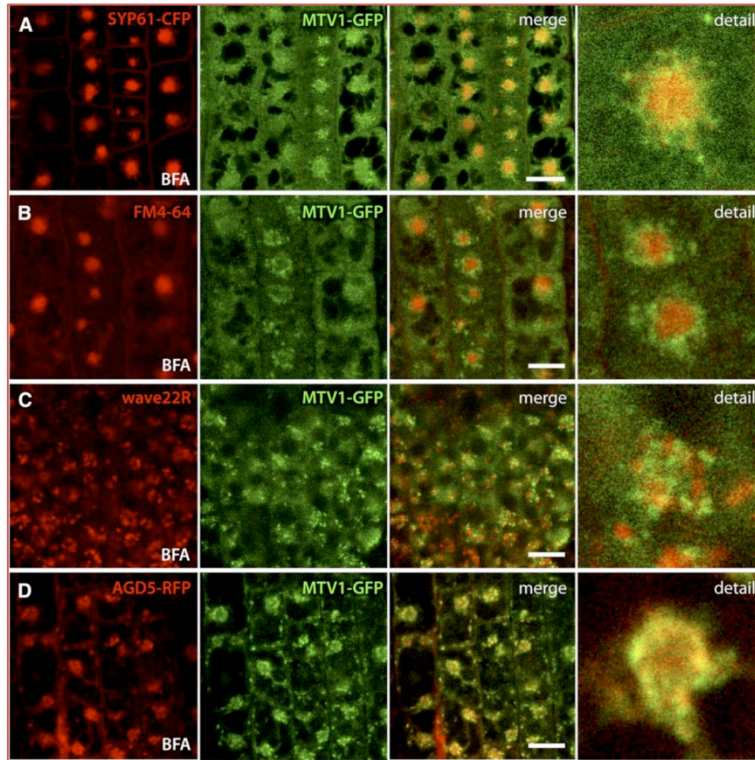


Figura 15. Las proteínas MTV1 y AGD5 se distribuyen en la periferia de los cuerpos de BFA.

(A a D) Imágenes confocales de raíces de plantas de 6 dpq tratadas con BFA 50 μ m durante una hora. Las barras de la escala corresponden a 20 μ m.

- (A) MTV1-GFP se localiza en la periferia de los cuerpos de BFA a diferencia del marcador de TGN SYP61-CFP (señal roja) que está localizado en la parte central.
- (B) MTV1-GFP se localiza en la periferia de los cuerpos de BFA a diferencia del FM4-64 (señal roja) que está localizado en la parte central.
- (C) La señal de MTV1-GFP no colocaliza con la señal del marcador de Golgi wav22R (SYP32), que también se encuentra en la periferia de los cuerpos de BFA.
- (D) MTV1-GFP y MTV4/AGD5-RFP colocalizan específicamente en la periferia de los cuerpos de BFA.

Las barras de la escala corresponden a 20 μ m.

Estos resultados sugieren que MTV1 y AGD5 co-localizan en un subdominio del TGN caracterizado por su distribución periférica en el cuerpo de BFA. La localización de MTV1 y de AGD5 en el TGN y su patrón de redistribución en respuesta a BFA es muy semejante a lo descrito para la clatrina (Ito et al., 2012). Para comprobar la colocalización de MTV1 con clatrina, se analizaron plantas que expresaban MTV1-mCherry (MTV1-RFP) y la cadena ligera de clatrina fusionada a GFP (CLC-GFP). Se observó una colocalización casi total de la señal de MTV1-RFP con CLC-GFP (Figura 16A). Además, después del tratamiento con BFA, CLC-GFP y MTV1-RFP colocalizan en la periferia de los cuerpos de BFA (Figura 16B). Estos resultados indican que MTV1, AGD5 y CLC colocalizan en un dominio específico del TGN donde MTV1 y AGD5 pueden participar en la formación de CCVs.

RESULTADOS

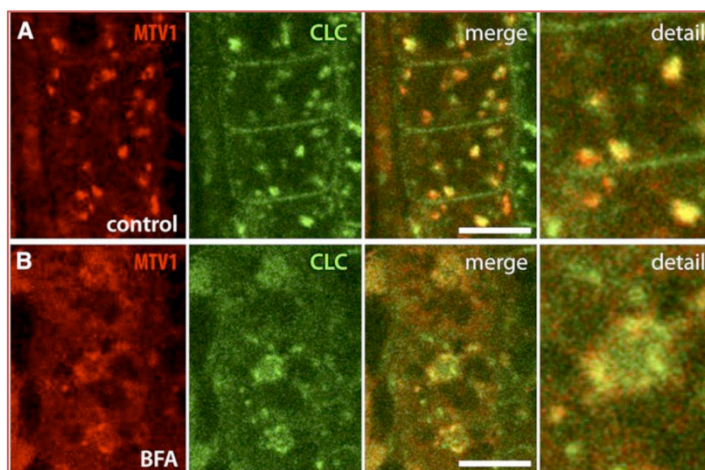


Figura 16. MTV1 y AGD5 colocalizan con clatrina.

- (A) Las señales de MTV1-RFP y CLC-GFP colocalizan en el interior de las células pero no en la membrana plasmática.
 - (B) Después de una hora de tratamiento con BFA, las señales de MTV1-RFP y CLC-GFP se localizan alrededor del cuerpo de BFA.
- Las barras de la escala corresponden a 20 μ m.

9. MTV1 y AGD5 actúan en el tráfico dependiente de clatrina desde el TGN

La presencia de los dominios ARF-GAP y ENTH en AGD5 y MTV1 sugiere que estas proteínas pueden participar en la formación de vesículas. Concretamente, podrían estar implicadas en la biogénesis de las CCVs que se forman en el TGN y transportan aleuraina en *Arabidopsis* (Hinz et al., 2007; Otegui et al., 2006). En colaboración con el Prof. Bednarek de la Universidad de Wisconsin, analizamos la presencia de AGD5 y MTV1 en CCVs purificadas a partir de cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis*. El análisis por microscopía electrónica de las muestras demostró que las CCVs fueron aisladas eficientemente con un alto grado de pureza (Figura 17A). Los análisis por western blot demostraron que AGD5 y MTV1 estaban enriquecidas en la fracciones de CCVs a un nivel parecido al de la cadena pesada de clatrina o al de la subunidad gamma del complejo adaptador de clatrina AP-1. Para corroborar este resultado, se realizaron ensayos de inmunolocalización en las fracciones de CCVs utilizando los anticuerpos anti-MTV1 y anti-AGD5. En ambos casos, se observaron numerosas CCVs marcadas fuertemente por los anticuerpos (Figura 17B-D). Es interesante destacar que solo una parte de las vesículas estaban marcadas, lo que concordaría con el marcaje específico de CCVs derivadas del TGN pero no de las derivadas de la MP. Si MTV1 y AGD5 están efectivamente implicados en la formación de vesículas en el TGN, su mutación podría provocar alteraciones en la morfología o en el tamaño

RESULTADOS

del TGN. De hecho en el mutante *nev* se han descrito defectos morfológicos del Golgi y del TGN en las células de la zona de abscisión de los órganos florales (Liljegren et al., 2009).

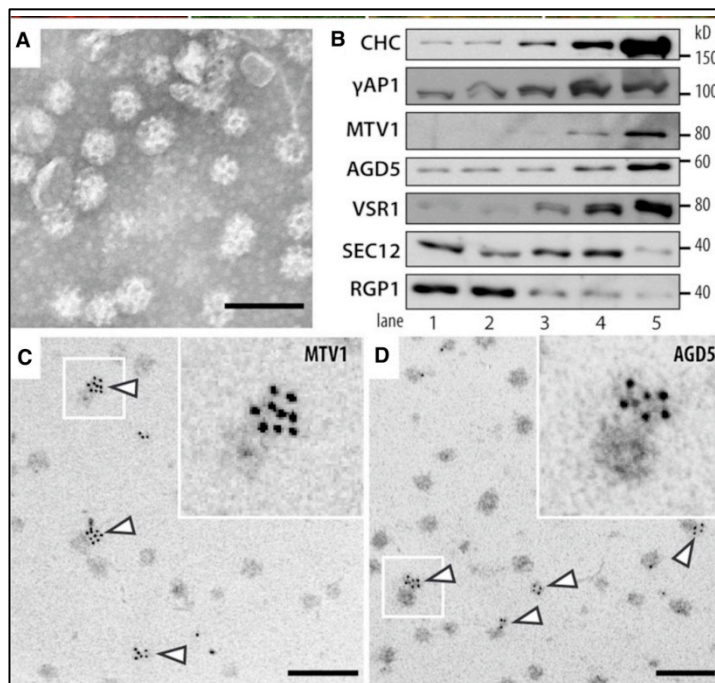


Figura 17. MTV1 y AGD5 están asociadas a las vesículas CCVs.

- (A) Imagen de microscopía electrónica que muestra el grado de purificación de las fracciones de CCVs.
- (B) Los ensayos por western blot demuestran que MTV1 y AGD5 se encuentran enriquecidos en las fracciones purificadas de CCVs (CHC).
- (C-D) Immunolocalización de MTV1 y AGD5 en las fracciones de CCVs purificadas. Las puntas de flecha de C y D indican la ubicación de MTV1 y AGD5 en las CCVs. Las barras de escala corresponden a 500 nm.

En colaboración con el Dr. York-Dieter Stierhof de la Universidad de Tübingen analizamos la ultra-estructura de las células del meristemo de la raíz del doble mutante *mtv1 agd5* por microscopia electrónica y observamos alteraciones morfológicas en el lado trans del Golgi y en el TGN, que consistían en un engrosamiento y una mayor curvatura de las cisternas (Figura 18A-B). Por el contrario, no se observaron cambios aparentes en el PVC aunque no se pueden excluir cambios o alteraciones morfológicas sutiles de tamaño o de número, que serían solamente perceptibles por un análisis cuantitativo de una gran cantidad de imágenes de microscopia electrónica. Los cambios en la morfología apoyan que MTV1 y AGD5 participan en la formación de CCV en el TGN. Un cargo principal de las CCVs son los receptores VSR (Hinz et al., 2007; Hinz et al., 1999; Kirsch et al., 1994) y por tanto su distribución podría estar alterada

RESULTADOS

en los mutantes *mtv1* y *agd5*. Para analizar esta posibilidad se realizó un fraccionamiento de microsomas en gradientes de densidad de sacarosa a partir de muestras de plantas Col-0 y de plantas mutantes y se compararon los perfiles de distribución de los VSRs en los gradientes. Tomando como referencia la distribución de VSRs en las plantas Col-0, no se encontraron cambios perceptibles en las plantas *mtv1*, se encontró una alteración débil en las plantas *agd5* y un cambio muy fuerte en plantas *mtv1 agd5* en las que los VSRs se desplazan mayoritariamente hacia fracciones mas densas del gradiente. La syntaxina SYP21 del PVC también se desplaza hacia fracciones más densas, aunque en menor grado (Figura 18C). Además de un cambio en la distribución de VSRs se observó un aumento fuerte en los niveles de VSRs en las plantas de *mtv1 agd5* (Figura 18D), un aumento que es compartido en otros mutantes afectados en el tráfico de VSRs (Uemura et al., 2012; Yamazaki et al., 2008; Zouhar and Rojo, 2009). El cambio drástico en la distribución y la acumulación de los VSRs sugiere que MTV1 y AGD5 son esenciales para el transporte de los VSRs en CCVs desde el TGN al PVC.

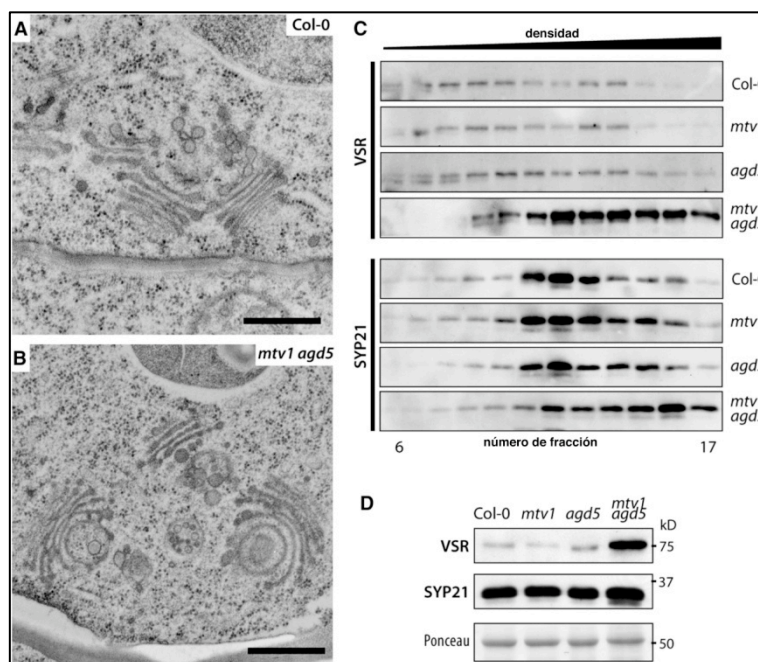


Figura 18. Alteraciones en el tráfico intracelular en el mutante *mtv1 agd5*.

- (A y B) Las imágenes por microscopía electrónica de las plantas *mtv1 agd5* muestran las alteraciones en la morfología de Golgi respecto a Col-0.
- (C) Los ensayos por western blot muestran que VSR1 se desplaza a fracciones mas densas en el mutante *mtv1 agd5*, al igual que le marcador de PVC SYP21. Las barras de escala corresponden a 200 nm.
- (D) Determinación por ensayos de western blot de los niveles de VSR1 y SYP21 en extractos totales de proteínas de los genotipos indicados.

10. MTV1 y AGD5 interactúan directamente con clatrina

Los datos de localización subcelular, los defectos en la distribución de VSRs y de aleurina, y las alteraciones morfológicas observadas en el TGN apoyan que MTV1 y AGD5 intervienen en la formación de CCVs en el TGN. Las proteínas con dominios ENTH en muchos casos unen directamente a clatrina, funcionando como adaptadores para la formación de CCVs. En *Arabidopsis* se ha comprobado que las proteínas con dominio ENTH EPSIN1, EPSIN2, y AtECA1 se unen directamente a clatrina (Lee et al., 2007; Song et al., 2006; Song et al., 2012). Además, las proteínas ArfGAP SMAP1 y 2, que son las más parecidas a AGD5 en mamíferos, interactúan físicamente con clatrina (Natsume et al., 2006; Tanabe et al., 2005). Por tanto, una hipótesis presumible es que MTV1 y AGD5 pueden unirse directamente a clatrina. El dominio canónico de unión a clatrina $L\phi P\phi P$ (donde L = leu, P = polar, ϕ = residuo hidrofóbico) no está presente ni en MTV1 ni en AGD5. Sin embargo, MTV1 contiene una versión levemente modificada (LIDTGD) que se ajusta a los motivos específicos de unión a clatrina de las proteínas de mamíferos GGA3, ACK1 y EPSIN1 (Dell'Angelica et al., 2000). Además, este motivo se conserva entre los ortólogos de MTV1 en plantas (anexo 1) sugiriendo que es funcionalmente relevante. MTV1 tiene también cinco motivos DLL o DxF situados en la región carboxilo de la proteína (Figura 19A) que participan en la unión a clatrina de la proteína Auxilina humana (Scheele et al., 2003). Para probar si MTV1 interactúa con clatrina se realizaron experimentos de copurificación del tipo "pull-down" entre distintas fusiones de MTV1 con la *S-transferasa del glutatión* (GST) y la subunidad grande de la clatrina (CHC) presente en extractos totales de proteínas. Se analizaron tres construcciones distintas de MTV1 fusionadas a GST, la proteína completa, la zona N-terminal (aminoácidos 1 a 134) que contiene el dominio ENTH, y el resto de la proteína, que contiene los motivos predichos de unión a clatrina. Los análisis mostraron la unión a clatrina de la proteína MTV1 completa y de la construcción C-terminal, pero no de la construcción N-terminal que contiene el dominio ENTH (Figura 19). Estos resultados indican que MTV1 une directamente con clatrina, muy probablemente a través de los motivos predichos en la mitad C-terminal de la proteína. En colaboración con el Dr. De Jaeger de la Universidad de Ghent se realizó una búsqueda de interactores de AGD5, mediante la expresión estable de MTV5 fusionada al epítipo TAP (TAP-AGD5), la purificación de proteínas por afinidad en dos pasos seriados y la posterior identificación de proteínas asociadas a TAP-AGD5 por espectrometría de masas. Se realizaron dos experimentos independientes y en ambos se identificó la copurificación de CHC con TAP-AGD5 (Figura 19D). Además, cuando la etiqueta se fusionó al extremo carboxilo de AGD5 (AGD5-TAP), CHC no se copurificaba, indicando que no hay unión inespecífica a la matriz y que la posición del epítipo

RESULTADOS

en el C-terminal de la proteína enmascara dominios importantes requeridos para la interacción. La interacción directa con clatrina apoya los datos genéticos y funcionales que indican que MTV1 y AGD5 participan en la formación de CCVs en el TGN para el transporte del cargo vacuolar al PVC.

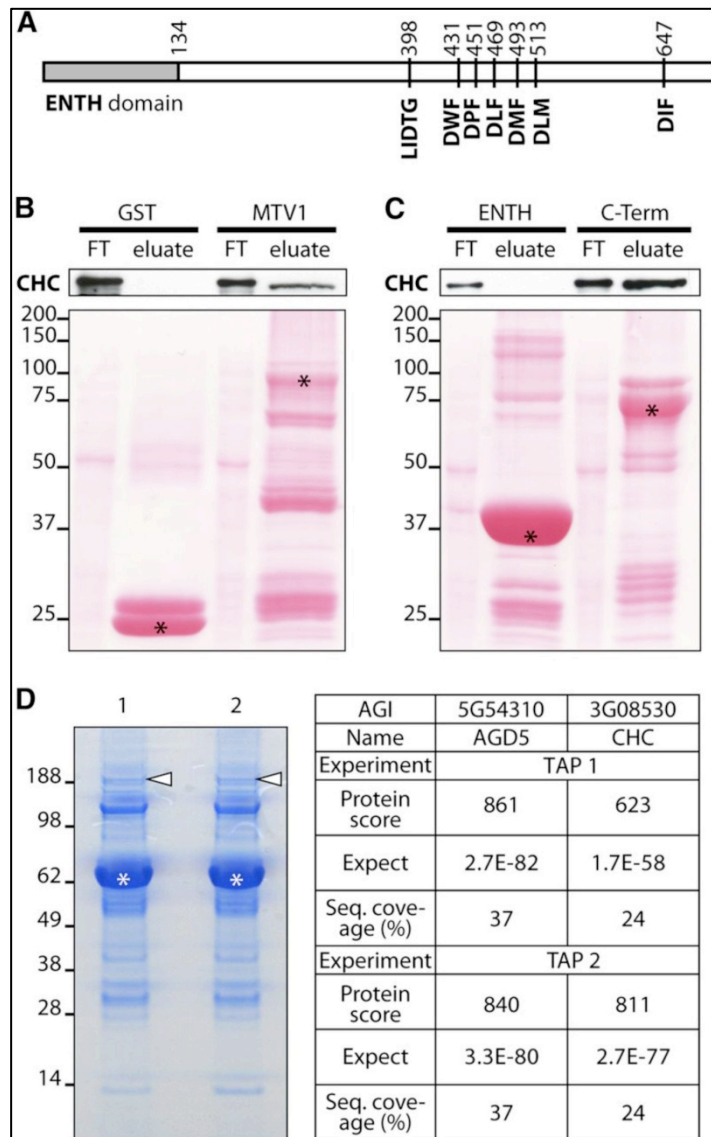


Figura 19. MTV1 y AGD5 se unen directamente a clatrina

(A) Esquema de la proteína MTV1 con los posibles motivos de unión a clatrina resaltados

(B-C) Ensayo tipo “pull down” de interacción entre la proteína MTV1 completa, el dominio ENTH o el resto de la proteína (C-terminal) y la cadena pesada de la clatrina (CHC).

(D) Identificación por afinidad en tándem de la cadena pesada de la clatrina (CHC) como interactor de AGD5

RESULTADOS

11. La pérdida de función de MTV3/PTEN2a y de su parálogo PTEN2b provoca la secreción de VAC2

Para obtener evidencias independientes de que la mutación del gen At3g19420/PTEN2a en *mtv3-1* era la responsable del fenotipo de terminación prematura del meristemo, se cruzó la línea de T-DNA Salk_114721C (*mtv3-2*) con la línea reportera VAC2.

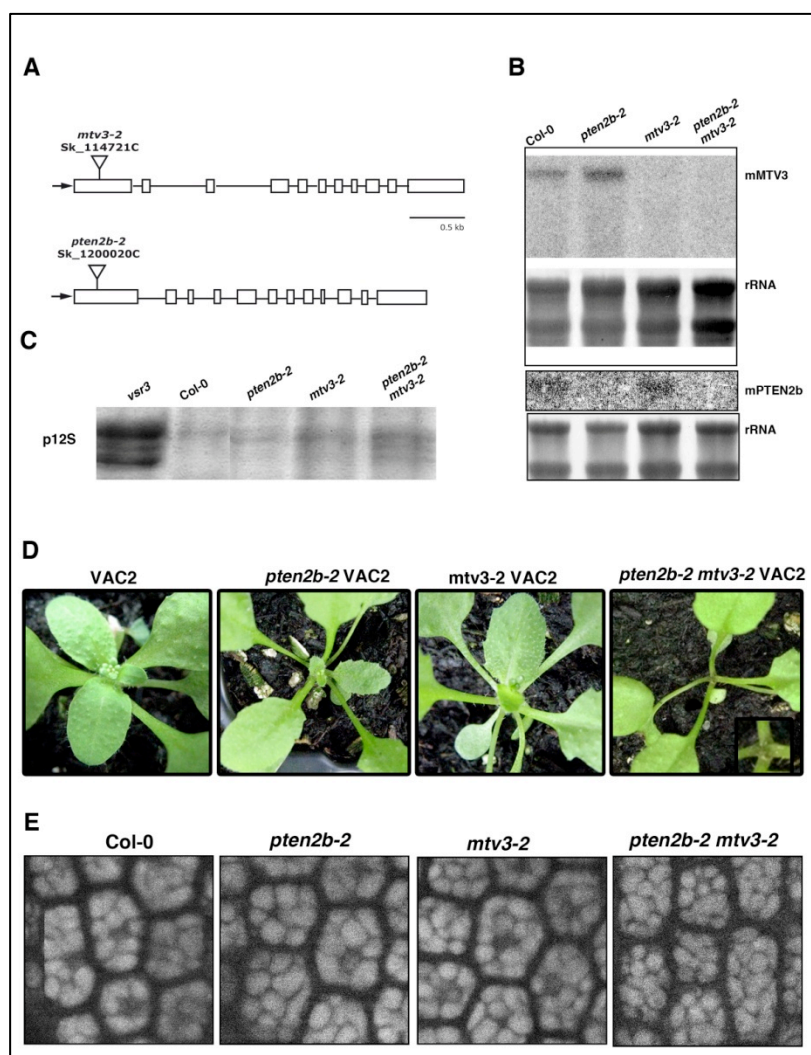


Figura 20. MTV3 y su parálogo PTEN2B están implicados en el tráfico de proteínas a vacuolas.

- Esquema gráfico de la posición de las inserciones de T-DNA en los mutantes *mtv3-2* y *pten2b-2*.
- Análisis por northern del RNA total de las plantas *Col-0*, *mtv3-2*, *pten2b-2* y *pten2b-2 mtv3-2* utilizando sondas específicas, que confirman que son alelos nulos.
- Los ensayos del perfil proteínico de las semillas de los mutantes nulos demostraron que el mutante *pten2b-2 mtv3-2* acumula precursores de las globulinas 12s.
- Fenotipo de los mutantes de T-DNA en presencia de VAC2. Solo el doble mutante *pten2b-2 mtv3-2* presenta fenotipo *mtv*.
- Los análisis por microscopia confocal de las semillas de las plantas mutantes no revelan cambios significativos de la morfología de las vacuolas de reserva respecto al tipo silvestre.

RESULTADOS

El mutante *mtv3-2* presenta la inserción de T-DNA en el primer exón del gen y no se detecta expresión del transcrito en plantas homocigotas (Figura 20), sugiriendo que es un alelo nulo. El desarrollo y crecimiento de las plantas *mtv3-2* es indistinguible de las plantas silvestres en condiciones normales. Al introducir el transgén VAC2 en el mutante *mtv3-2* no se observaron plantas que presentaran el fenotipo *mtv* de terminación temprana de los meristemas, aunque sí mostraban un pequeño retraso en el desarrollo de las primeras hojas, lo que podría indicar una secreción parcial de VAC2. Sin embargo la falta de un fenotipo claro no demostraba que MTV3 no fuera PTEN2a, ya que los alelos *mtv3-1* y *mtv3-2* podían tener efectos distintos sobre la función de PTEN2a. Mientras que el alelo *mtv3-1* es codominante y tiene una mutación puntual en PTEN2a, el alelo *mtv3-2* es nulo y seguramente recesivo. Por tanto, hipotetizamos que la falta de un fenotipo claro en *mtv3-2* podría deberse a la presencia de dos parálogos de At3g19420/PTEN2a en el genoma de Arabidopsis, At3g50110/PTEN2b y At5g39400/PTEN1, que podrían tener una función redundante. Para determinar si la pérdida de función en el mutante *mtv3-2* era compensada por su parálogo más próximo PTEN2b, se cruzaron plantas *mtv3-2* VAC2 con el mutante de inserción de T-DNA *pten2b-2*, (Salk_1200020C), que tiene un fenotipo silvestre. En la F3 del cruce se identificaron plantas con fenotipo *mtv* fuerte y los genotipados revelaron que se trataba de plantas homocigotas para el transgén VAC2 y para, *mtv3-2* y *pten2b-2* (Figura 20).

12. El alelo *mtv3-1* es de pérdida de función e interfiere con la proteína MTV3 silvestre

El análisis del doble mutante nulo *mtv3-2 pten2b-2* indica que la actividad de MTV3 y PTEN2b es necesaria para el transporte a vacuolas de VAC2. Para determinar si la secreción de VAC2 en *mtv3-1* también se debía a una pérdida de función, se comparó el fenotipo al combinar este alelo con el alelo nulo *mtv3-2* y con el alelo silvestre MTV3. Este análisis mostró que las plantas *mtv3-1/mtv3-1* VAC2 y *mtv3-1/mtv3-2* VAC2 presentan fenotipo *mtv* extremo, las plantas *mtv3-1/MTV3* VAC2 presentan un fenotipo *mtv* intermedio y las plantas *mtv3-2/mtv3-2* VAC2, *mtv3-2/MTV3* VAC2 y *MTV3/MTV3* VAC2 no presentan fenotipo *mtv*. Estos datos indican que la mutación *mtv3-1* es de pérdida de función, ya que el fenotipo se reduce en presencia de una copia funcional de *MTV3* pero no cuando se combina con el alelo nulo *mtv3-2*. Además, el hecho de que el fenotipo de *mtv3-1* sea codominante, más fuerte que el del alelo nulo *mtv3-2* y similar al del doble mutante *mtv3-2 pten2b-2*, indica que la mutación *mtv3-1* debe interferir con la función tanto de *MTV3* como de su parálogo gen *PTEN2b*.

RESULTADOS

13. Patrón de expresión de MTV3

Para determinar el patrón de expresión del gen MTV3/PTEN2A se generaron líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* que portaban una construcción de la región genómica del gen *MTV3* fusionada al gen reportador de la β -glucuronidasa (*promMTV3:MTV3-GUS*). El análisis de estas plantas reveló una expresión generalizada en todos los estadios de desarrollo de la planta. A nivel de órgano se observó expresión de GUS en la raíz, el tallo, tejidos vasculares de las hojas y en polen. Además se observó un alto nivel de expresión en zonas de crecimiento activo como la punta de la raíz principal y las raíces laterales. En las primeras fases del desarrollo embrionario los niveles de expresión de *promMTV3:MTV3-GUS* son bajos, aumentando en embriones más desarrollados, coincidiendo con el momento de mayor síntesis de proteínas de reserva, lo que sugiere una función en el tráfico de estas proteínas (Figura 21).



Figura 21. Patrón de expresión del gen *MTV3* durante el desarrollo de la planta.

Análisis histológico de la actividad del reportero GUS en las plantas *promMTV3:MTV3-GUS*.

i) Raíz lateral, ii) raíz principal, iii) planta 14 dpv, iv) hoja de planta crecida en tierra, v) flores en varios estados de desarrollo, vi) embrión en estado de corazón, vii) embrión en estado lineal, viii) embrión maduro.

RESULTADOS

14. Ensayo de la unión de MTV3 a fosfoinosítidos

MTV3 contiene un dominio C2 de unión a fosfolípidos dependiente de calcio (Perez-Sancho et al., 2016). Para determinar si MTV3 se une a fosfolípidos y con que especificidad, se purificó la proteína recombinante expresada en *Escherichia coli* y se realizó un ensayo “fat-blot” de unión a distintos lípidos (Figura 22). Este ensayo demostró que MTV3 se une preferentemente a fosfoinosítidos, presentado la mayor afinidad por fosfatidilinositol.

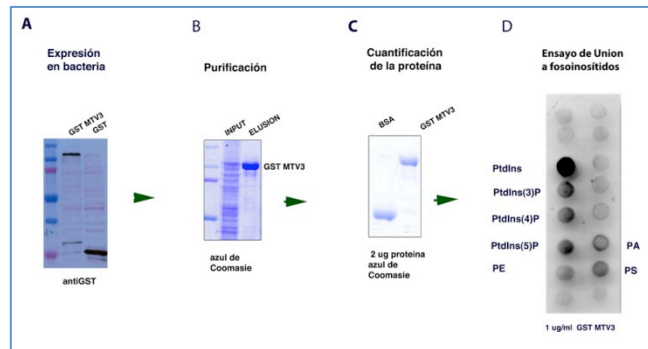


Figura 22. Perfil de unión de MTV3 a fosfolípidos.

15. MTV3 se localiza en el citoplasma y en el TGN

En ensayos de expresión transitoria en protoplastos de *Arabidopsis* observamos que *mtv3-1-GFP* tiene una localización casi totalmente citosólica, mientras que MTV3-GFP presentaba una mayor presencia en estructuras punteadas (Figura 23). Para confirmar estos resultados analizamos plantas que expresaban establemente MTV3 fusionado a GFP bajo el control de su propio promotor. La región promotora de 1500 pb previa al codón de inicio junto con la región codificante de MTV3 se fusionaron al gen reportador GFP para generar las líneas transgénicas *promMTV3:MTV3-GFP*. Asimismo, se generaron líneas equivalentes *promMTV3:mtv3-1-GFP* en las que la única diferencia era la mutación puntual *mtv3-1*. Las líneas obtenidas expresaban de forma general niveles significativamente más altos de los transgenes que del gen endógeno lo que sugiere que regiones que regulan negativamente la expresión de *MTV3* no estaban incluidas en las construcciones generadas y que las líneas se pueden considerar de sobreexpresión. En las raíces de las plantas *promMTV3:MTV3-GFP* se observó la señal de GFP distribuida en el citosol y en pequeñas estructuras puntiformes que podrían corresponderse con compartimentos del sistema de endomembranas (Figura 24).

RESULTADOS

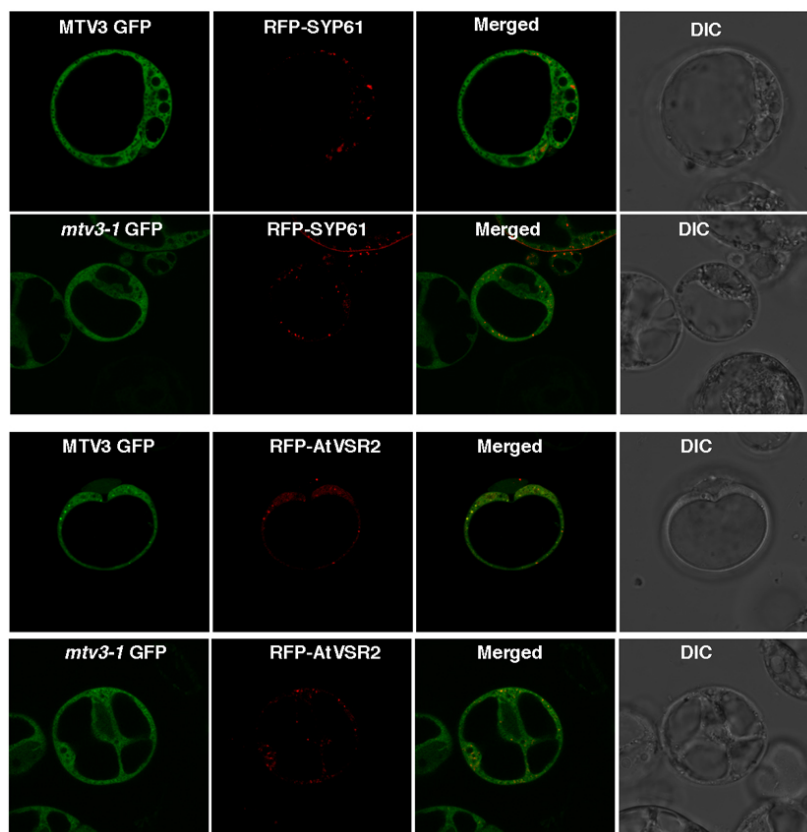


Figura 23. Localización de MTV3-GFP y *mtv3-1*-GFP en protoplastos de Arabidopsis.

Los protoplastos de Col-0 fueron transformados de manera transitoria con las proteínas MTV3-GFP o *mtv3-1*-GFP junto con RFP-VSR2, un marcador de PVC, o RFP-SYP61, un marcador de TGN. Los análisis por microscopía confocal muestran que la localización de MTV3-GFP Y *mtv3-1*-GFP es principalmente citoplasmática. Hay cierto solapamiento de las señales de MTV3-GFP y RFP-VSR2 en estructuras puntiformes correspondientes a PVC.

En la raíces de las plantas *promMTV3:mtv3-1-GFP* la señal de GFP era casi completamente citosólica y sólo se observaban algunas estructuras puntiformes de menor tamaño que en las plantas *promMTV3:MTV3-GFP* (Figuras 24-25). Los niveles de expresión de los transgenes en ambas líneas eran equivalentes, por lo que se puede deducir que las diferencias en la localización intracelular de *promMTV3:MTV3-GFP* y *promMTV3:mtv3-1-GFP* se deben a la mutación en *mtv3-1* y no a la “sobre-expresión” o por efecto de la fusión de GFP en el extremo carboxilo.

RESULTADOS

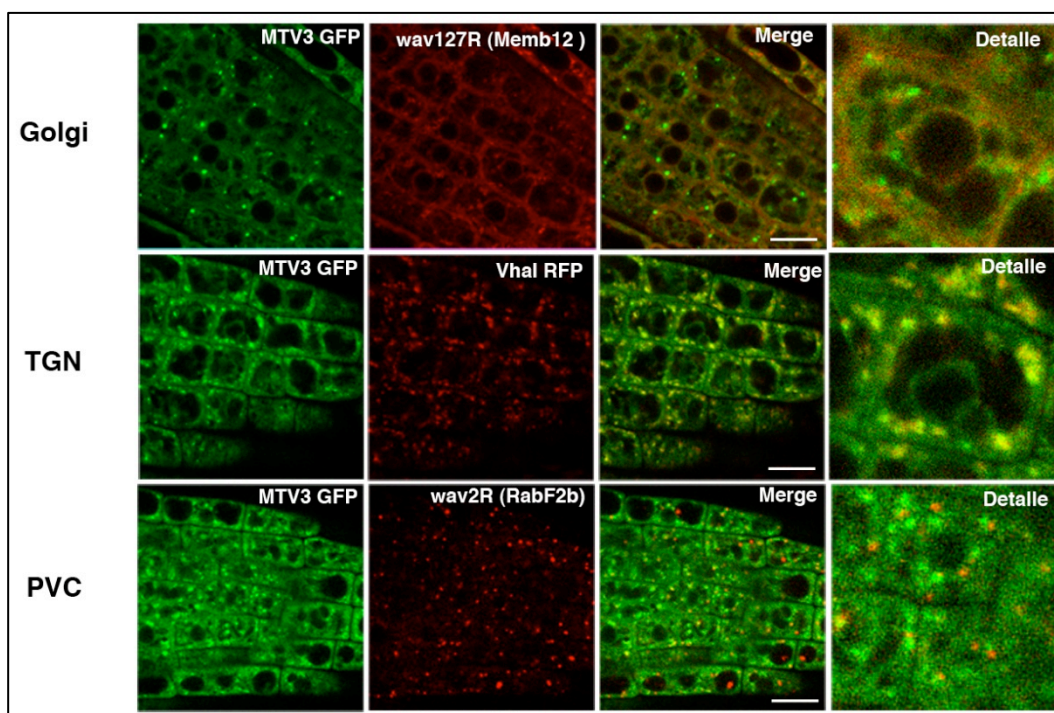


Figura 24. MTV3 se localiza en citoplasma y en el TGN.

Imágenes de confocal de raíces de plantas *promMTV3:MTV3-GFP* cruzadas con marcadores fluorescentes (RFP) de Golgi, TGN o PVC. MTV3GFP se localiza en el citoplasma y en estructuras puntiformes que colocalizan con el marcador del TGN. Las barras de la escala corresponden a 10 μ m.

Para determinar la identidad de las estructuras puntiformes se cruzaron las líneas *promMTV3:MTV3-GFP* y *promMTV3:mtv3-1-GFP* con marcadores fluorescentes específicos para los diferentes compartimentos de endomembranas. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que la señal de las líneas marcadoras de Golgi wav22R (SYP32) y wav127R (MEMB12) no coincidían con los gránulos que se observan en *mtv3-1-GFP* y *MTV3-GFP*, respectivamente, lo que nos indicaba que podría estar localizada en un compartimento cercano. Cuando se analizaron las raíces de las plantas que expresaban *MTV3-GFP* y el marcador de TGN *Vha1-RFP*, se observó que la señal puntiforme de *MTV3-GFP* coincidía casi exactamente con la señal de *Vha1-RFP* pero no con el marcador de PVC *RabF2b*.

RESULTADOS

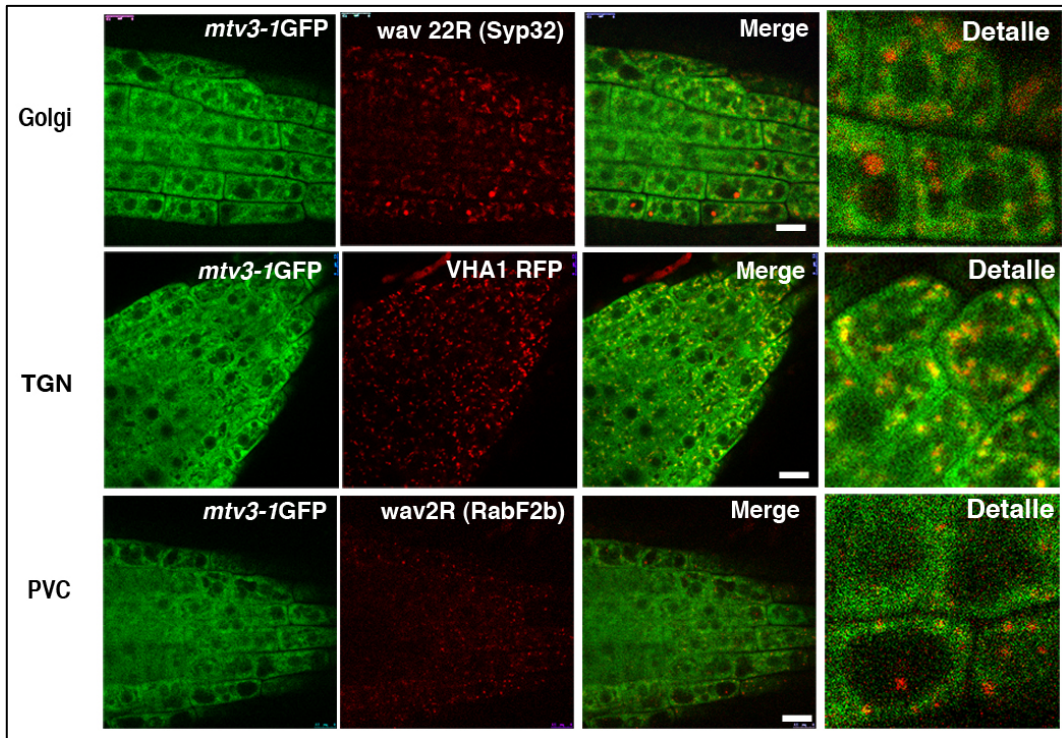


Figura 25. La mutación *mtv3-1* afecta la localización de la proteína.

Imágenes de confocal de raíces de plantas *promMTV3:mtv3-1-GFP* cruzadas con marcadores fluorescentes (RFP) de Golgi, TGN o PVC. *mtv3-1-GFP* se localiza casi totalmente en el citoplasma y raramente en estructuras puntiformes. Las barras de la escala corresponden a 10µm.

Estos resultados indican que MTV3-GFP es una proteína citosólica que se asocia transitoriamente con el TGN. En cambio *mtv3-1-GFP* es mayoritariamente citoplasmática, sugiriendo que la mutación en *mtv3-1* afecta la interacción con el TGN, posiblemente al reducir la afinidad con los fosfoinosítidos de membrana. Para confirmar la localización de MTV3 y de *mtv3-1* se realizó un fraccionamiento de proteínas en gradientes de densidad de sacarosa a partir de las plantas Col-0, *promMTV3:MTV3-GFP*, *promMTV3:mtv3-1-GFP* y del mutante nulo *mtv3-2*. Se compararon los perfiles de distribución de MTV3, VSR y VT11 en los gradientes (Figura 26). MTV3-GFP y *mtv3-1-GFP* se localizaron principalmente en las primeras fracciones, que corresponden a las proteínas solubles. En el caso de MTV3-GFP, un fracción significativa se distribuyó en fracciones que contienen también los VSR y VT111. Estos resultados apoyan que MTV3-GFP está más asociado a membranas que *mtv3-1-GFP*, y que se localiza en endosomas. Además, al comparar el perfil de VSR en los diferentes gradientes se observó una mayor acumulación de VSR en el mutante *mtv3-2* y en las plantas *promMTV3:MTV3-GFP*, *promMTV3:mtv3-1-GFP* respecto al tipo silvestre, si bien su distribución no se veía alterada. Al

RESULTADOS

analizar los perfiles de VTI11 y SYP21 no se encontraron diferencias en la intensidad de señal ni en su distribución.

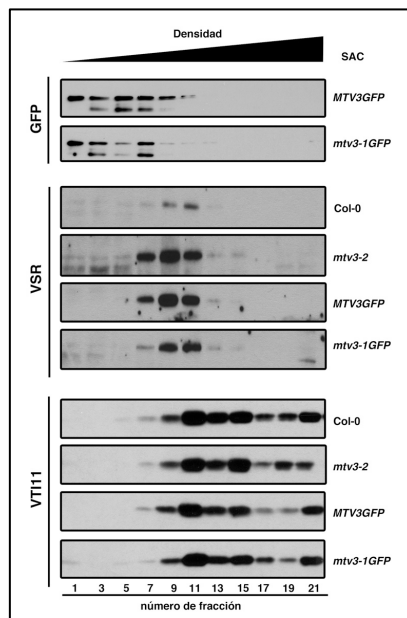


Figura 26. Distribución de MTV3 y *mtv3-1* en gradientes de sacarosa.

Análisis de la presencia de VSR, VTI11, MTV3-GFP y *mtv3-1*-GFP en las fracciones de un gradiente de sacarosa preparado con muestras de los genotipos indicados.

16. La sobre-expresión de MTV3 fusionado a GFP causa la secreción de VAC2

Como se ha mencionado antes, las líneas *promMTV3:MTV3-GFP* y *promMTV3:mtv3-1-GFP* expresaban niveles de transcrito significativamente más altos que los del gen *MTV3* endógeno por lo que pueden considerarse como líneas de sobreexpresión. Además estas líneas muestran un aumento en la acumulación de los VSRs, que es un fenómeno extendido en mutantes de tráfico vacuolar. Para testar si esta sobreexpresión tiene un efecto sobre el tráfico vacuolar, se seleccionaron dos líneas representativas de cada construcción para cruzarlas con las líneas L1 y L2 que portan el transgén *VAC2*. Las plantas de la F1 de los cruces de líneas *promMTV3:MTV3-GFP* con L1 y L2 presentaban fenotipo *mtv*, con la mayoría de flores sin carpelos y una baja producción de semillas.

RESULTADOS

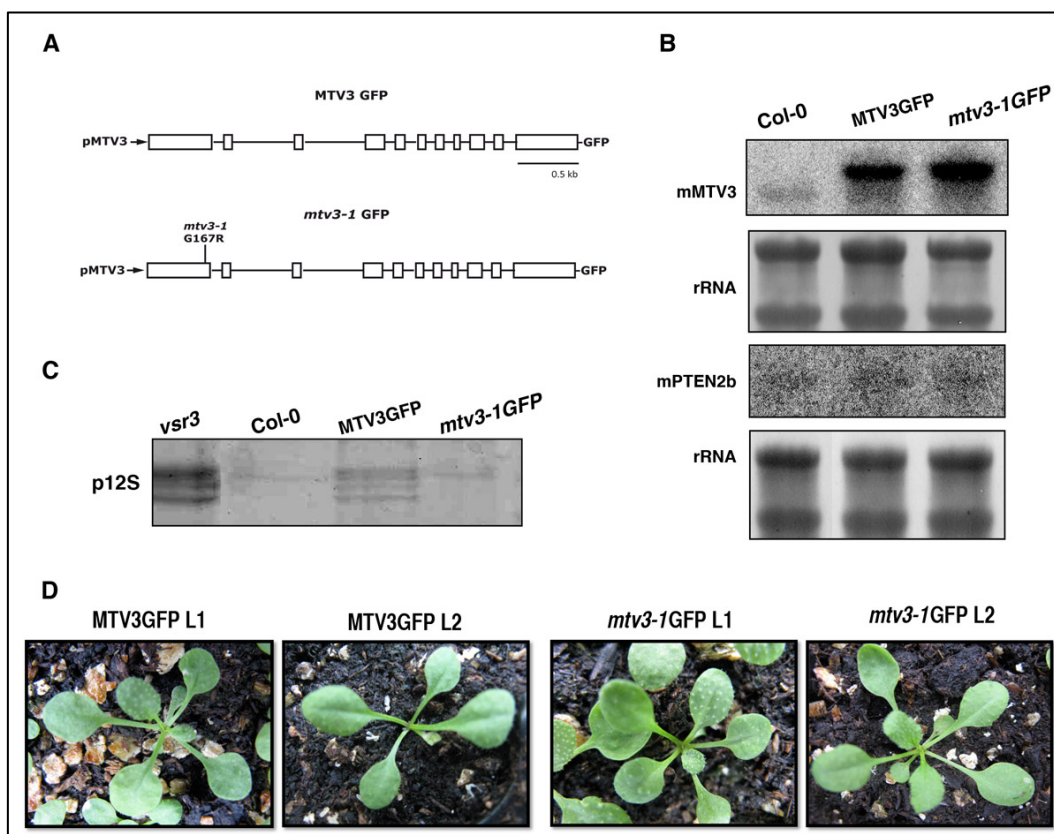


Figura 27. La sobreexpresión de MTV3-GFP y *mtv3-1*-GFP afecta el tráfico de proteínas endógenas a la vacuola.

- (A) Esquema gráfico de las construcciones utilizadas para la transformación de las plantas transgénicas *promMTV3:MTV3-GFP* (MTV3-GFP) y *promMTV3:mtv3-1-GFP* (*mtv3-1-GFP*).
- (B) Determinación de la expresión de MTV3 y PTEN2b por ensayo tipo northern en las líneas transgénicas.
- (C) Acumulación de precursores de las globulinas 12s en las líneas transgénicas.
- (D) La F2 de los cruces entre la línea reportera VAC2 y MTV3-GFP o *mtv3-1*-GFP presentan fenotipo *mtv*.

Por el contrario, las plantas de la F1 de los cruces de líneas *promMTV3:mtv3-1-GFP* con L1 y L2 no presentaban fenotipo *mtv*. Sin embargo, en la F2, las plantas homocigotas para *promMTV3:mtv3-1-GFP* y para VAC2 sí que presentaban fenotipo de meristemo terminado, al igual que las homocigotas para *promMTV3:MTV3-GFP* y VAC2 (Figura 27). También se generaron líneas transgénicas que expresaban las construcciones *pUb:mCherry-MTV3* y *pUb:Cherry-mtv3-1*, que al introducirles el transgén VAC2 presentaban en ambos casos un fenotipo *mtv* severo. Estos resultados indican que la sobreexpresión de MTV3 o *mtv3-1* fusionadas a GFP o RFP interfieren con el transporte de VAC2 a vacuola (Figura 27).

17. MTV3 está implicado en el transporte de las proteínas vacuolares endógenas

El patrón de expresión de *MTV3* sugiere un papel en el transporte de proteínas vacuolares de reserva durante el desarrollo del embrión. Para determinar si es así, se realizó una comparación del perfil proteico de semillas de tipo silvestre (Col-0) y de semillas de los mutantes nulos *mtv3-2*, *pten2b-2* y *pten2-2bmtv3-2*, así como de las plantas *promMTV3:MTV3-GFP* y *promMTV3:mtv3-1-GFP* que también secretaban el marcador VAC2. En el mutante *pten2-2b mtv3-2* y en las plantas *MTV3-GFP* se detectó la presencia de precursores de las globulinas 12S, indicando que su transporte a vacuola estaba afectado. Por otro lado, no se detectó acumulación de precursores en el resto de las plantas, en consonancia con un menor fenotipo (plantas *promMTV3:mtv3-1-GFP*) o con la ausencia de fenotipo (plantas *mtv3-2*, *pten2b-2*) en presencia del transgén *VAC2* (Figura 27).

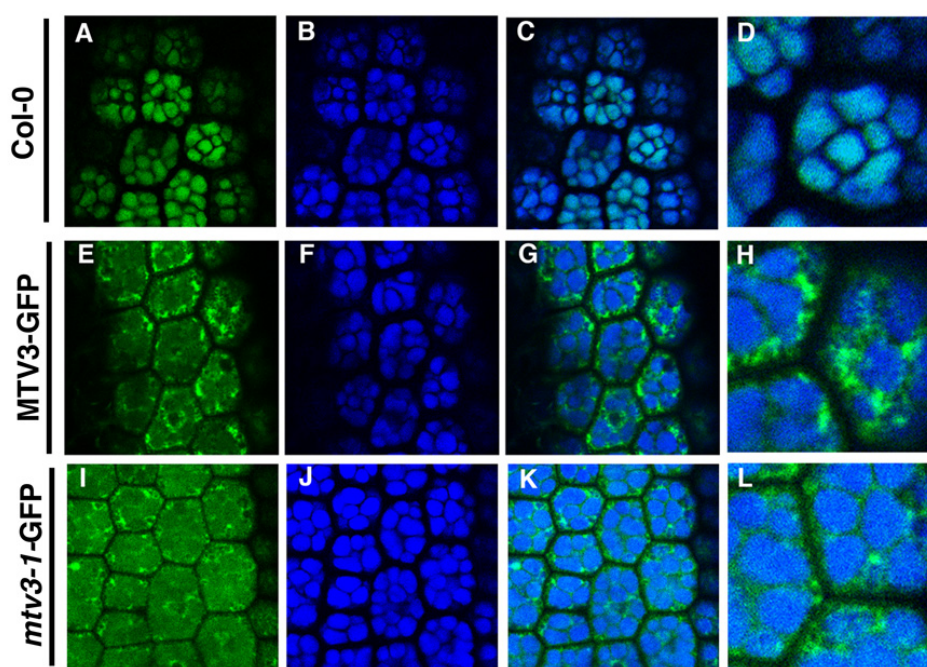


Figura 28. La sobreexpresión de *MTV3-GFP* y *mtv3-1-GFP* afecta a la autofluorescencia de las vacuolas de reserva de semillas TGN.

Imágenes de semillas Col-0 (A-D), *promMTV3:MTV3-GFP* (E-H) y *promMTV3: mtv3-1-GFP* (I-L). La primera columna muestra la señal de autofluorescencia y de la GFP excitadas con el láser de 488 nm y en un rango de emisión de 500-540 nm (señal verde), la segunda columna muestra la autofluorescencia excitada con el láser de 543 nm y en un rango de emisión de 560-650 nm. La tercera y cuarta columnas muestran el solapamiento entre ambas imágenes

RESULTADOS

El análisis por microscopía de las semillas de los mutantes no mostró diferencias claras en la morfología o en el tamaño de las vacuolas de reserva en las semillas de los mutantes o de las líneas trasgénicas. Sin embargo, sí que observamos que en las semillas de las plantas *promMTV3:MTV3-GFP* la autofluorescencia de las vacuolas en la región entre los 500 y 540 nm estaba reducida (Figura 28, comparar paneles A, E, I), lo cual indica que algún compuesto autofluorescente no se acumula adecuadamente en las vacuolas de esas plantas.

18. La sobreexpresión de MTV3-GFP causa la deslocalización de VTI12

Para comprobar que las estructuras puntiformes observadas en las plantas *promMTV3:MTV3-GFP* se correspondían con el TGN, se cruzaron con un segundo marcador de este compartimento, VTI12-RFP. Las imágenes de microscopía confocal confirmaron la coincidencia entre las dos señales, lo que indica que MTV3-GFP se encuentran en el TGN. Además, las imágenes revelaron cambios en la localización de VTI12-RFP en las plantas *promMTV3:MTV3-GFP*, en las que se encontró que la señal RFP marcaba el tonoplasto y también grandes agregados que se desplazaban dentro del lumen de la vacuola (Figuras 29 y 30).

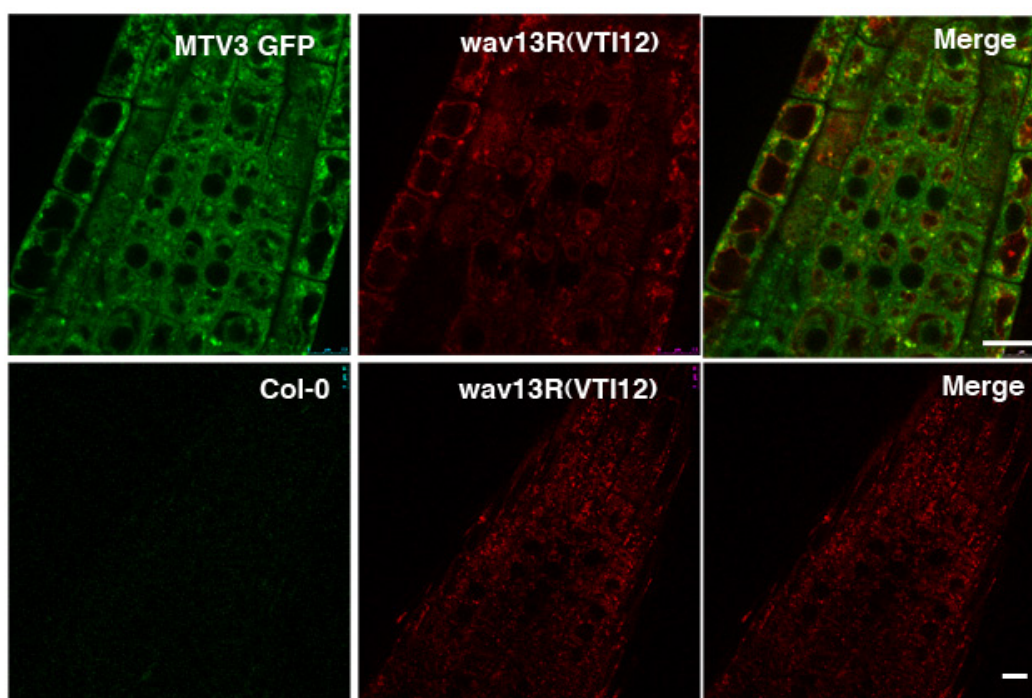


Figura 29. La expresión de MTV3-GFP afecta la localización subcelular de VTI12.

Las barras de la escala corresponden a 10 μ m.

RESULTADOS

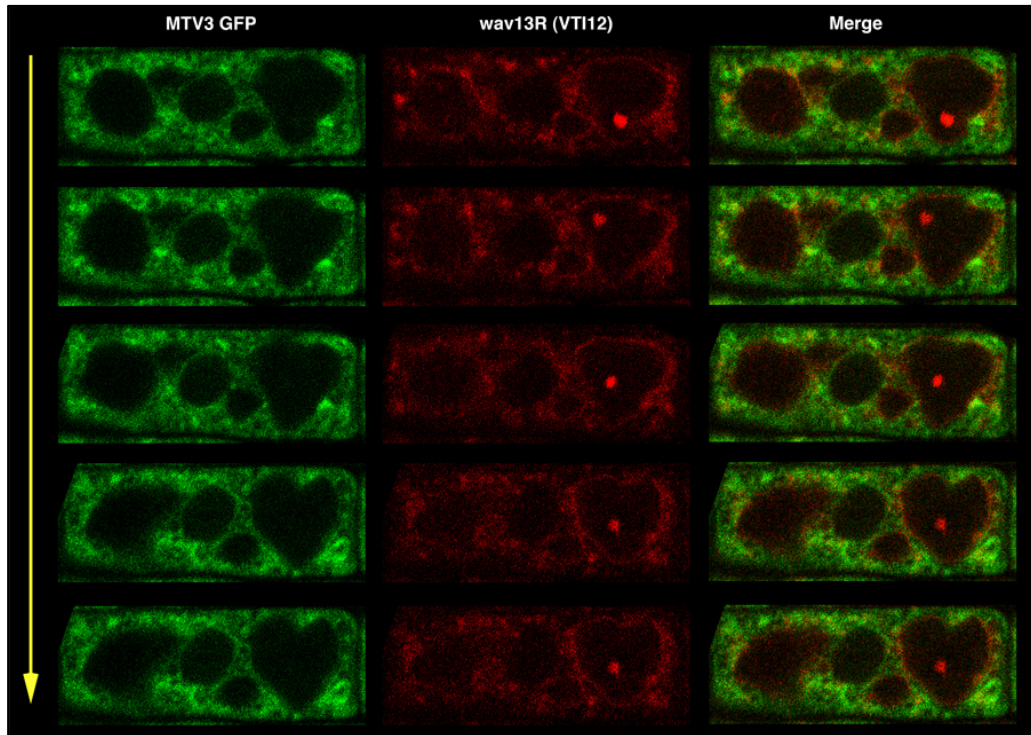


Figura 30. Los agregados de VTI12 en el interior del lumen de la vacuola de las plantas *promMTV3:MTV3-GFP* son móviles. Secuencia temporal (en el sentido de la flecha) de la señal de MTV3-GFP y VTI12-RFP en una célula de raíz.

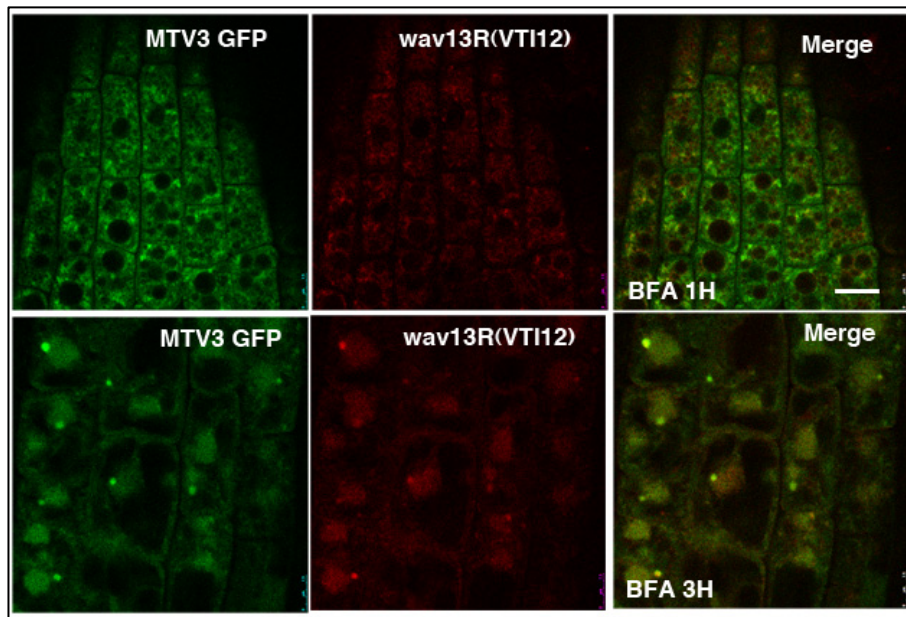


Figura 31. VTI12 y MTV3 colocalizan parcialmente en compartimentos resistentes al BFA.

Las raíces de las plantas MTV3-GFP VTI12-RFP tratadas con BFA 50 μ M durante 1h (paneles superiores) o 3 h (paneles inferiores). Las barras de la escala de la figura superior corresponden a 10 μ m, inferior a 2.5 μ m.

RESULTADOS

Además, el tratamiento con BFA muestra que una gran parte de MTV3-GFP y VTI12-RFP colocalizan en los cuerpos de BFA, pero también se mantiene estructuras puntiformes con alta intensidad de señal de GFP y RFP que no se localizan en los cuerpos BFA (Figura 31).

19. La sobreexpresión de RFP MTV3 afecta la localización del marcador de PI(3)P

MTV3 tiene actividad fosfatasa sobre los fosfoinosítidos, defosforilándolos *in vitro* en la posición 3'. Para analizar si MTV3 afecta a la distribución de fosfoinosítidos, se cruzó la línea *pUb:RFP-MTV3* con la línea reportera YFP 2xFYVE, que se une de manera específica a PI3P *in vivo*. No se observaron coincidencias en las señales YFP y RFP, pero se encontraron alteraciones en la distribución de la señal YFP.

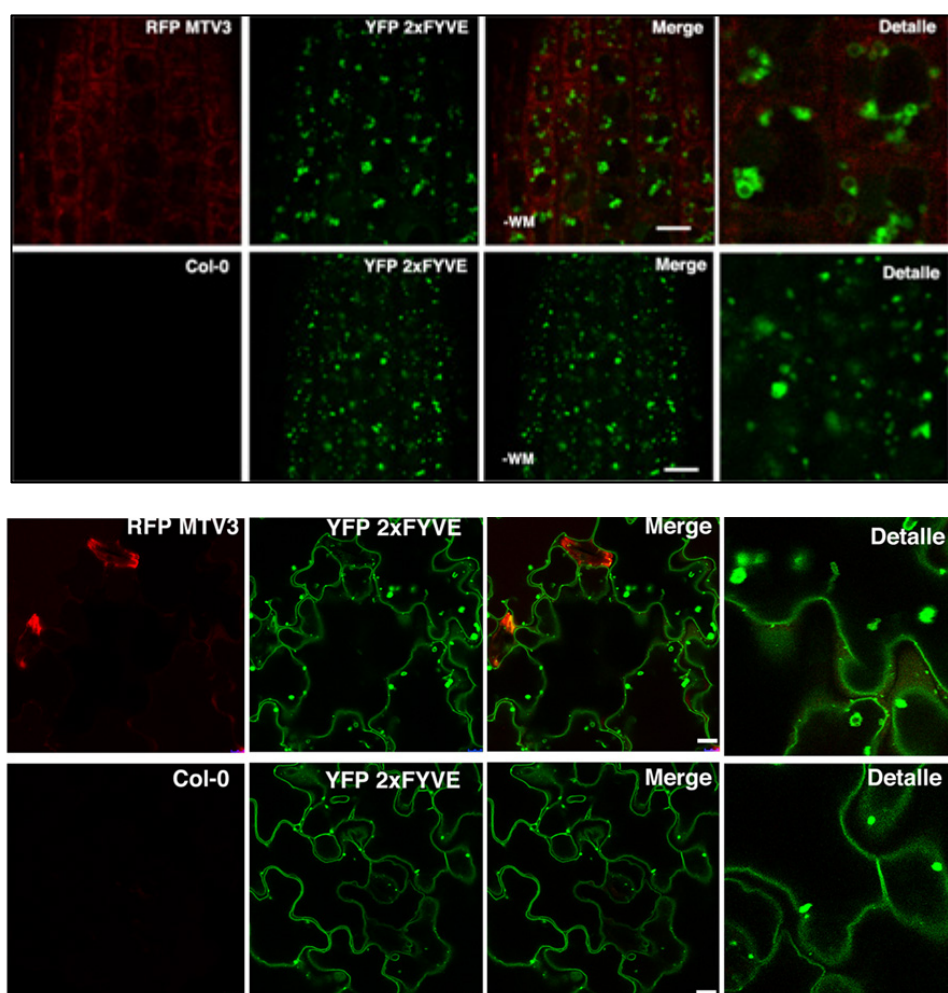


Figura 32. La sobreexpresión de RFP-MTV3 afecta la distribución de PI3P y la morfología del PVC.

Análisis confocal de las raíces y cotiledones de las plantas RFP MTV3 YFP 2xFYVE y YFP 2xFYVE a 6dpg. Las barras de la escala corresponden a 10µm.

RESULTADOS

Mientras que en plantas silvestres la localización de YFP 2xFYVE era típicamente punteada, en las plantas RFP-MTV3 la señal formaba grandes círculos (Figura 32). Estas estructuras anulares presentes en las células de las plantas RFP-MTV3 YFP 2xFYVE recordaban a los PVC agrandados que se producen al tratar plantas con wortmanina, un inhibidor de PI3 quinasa y PI4 quinasa. De hecho, al tratar las plantas con wortmanina se formaban las estructuras circulares en las plantas YFP 2xFYVE y ya no había diferencias con las plantas RFP MTV3 YFP 2xFYVE tratadas con wortmanina (Figura 33).

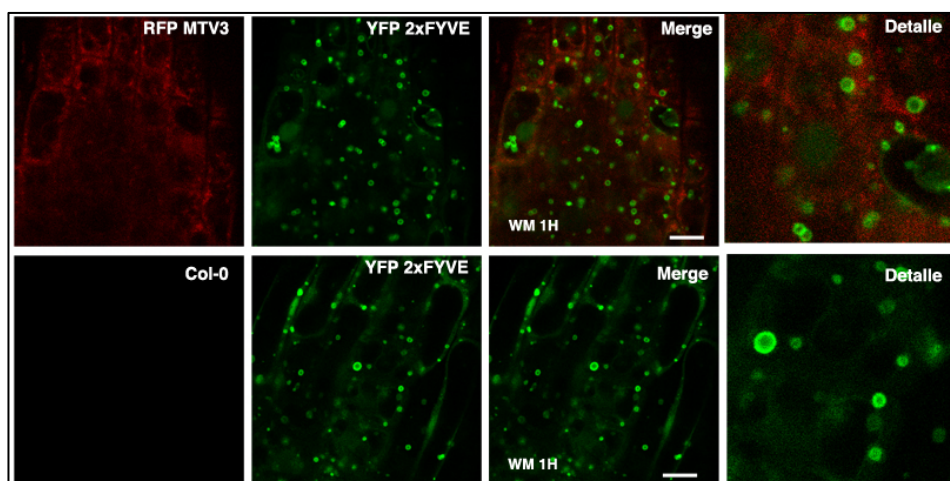


Figura 33. El tratamiento con wortmanina provoca el mismo efecto que la sobreexpresión de RFP MTV3 sobre la localización de YFP2xFYVE. Imágenes por microscopía confocal de las plantas tratadas con wortmanina 33 μ M durante 1h. Las barras de la escala corresponden a 10 μ m.

20. La sobreexpresión de RFP MTV3 acelera la senescencia por autofagia

En las plantas RFP MTV3 YFP 2xFYVE, se observó un fenotipo de senescencia acelerada en las hojas de la roseta después de 3 semanas, lo que nos sugería que MTV3 podría estar involucrado en este mecanismo. Para determinar si MTV3 tiene una función en este proceso, se realizó un experimento con hojas incubadas en oscuridad, que induce la autofagia y la posterior senescencia. Después de 7 días en oscuridad, las hojas de RFP MTV3, YFP 2xFYVE y RFP MTV3 YFP 2xFYVE presentaban una clorosis mayor en comparación con las hojas de Col-0, siendo más evidente en las hojas de RFP-MTV3 YFP 2xFYVE (Figura 34). La cuantificación de la clorofila de estas hojas ratificaron las observaciones visuales, y sugieren que la co-expresión de

RESULTADOS

RFP MTV3 y YFP 2XFVE produce un efecto sinérgico acelerando la senescencia dependiente de autofagia.

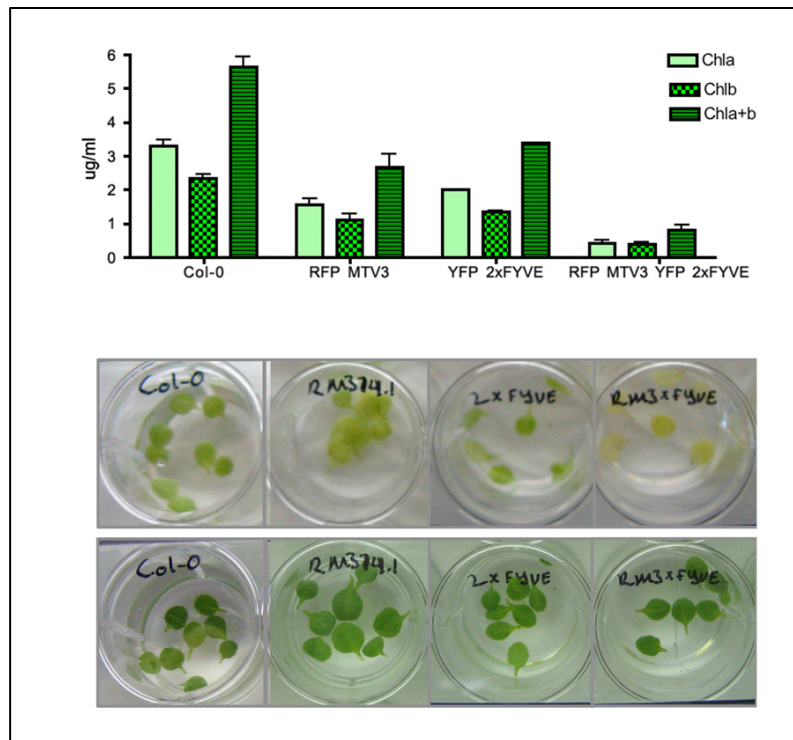


Figura 34. Ensayo de autofagia en plantas que sobrexpresan MTV3.

Las dos primeras hojas de las plantas RFP MTV3, YFP 2xFYVE y RFP MTV3 YFP se mantuvieron en oscuridad en un medio carente de sacarosa, posteriormente se realizó la cuantificación de clorofila. En la parte inferior se pueden comparar las hojas antes y después del ensayo. Diámetro del pocillo corresponde a 2 cm.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. El rastreo de mutantes *mtv* es eficiente para identificar la maquinaria de tráfico vacuolar

El Dr. Schekman fue el pionero del análisis genético del tráfico intracelular, usando como organismo modelo las levaduras. En 1980 describió un rastreo para aislar mutantes afectados en la secreción (mutantes Sec) con el que identificó numerosas proteínas implicadas en distintos pasos del tráfico vesicular (Schekman and Novick, 2004). Posteriormente se diseñaron otros rastreos genéticos en levaduras para estudiar específicamente el tráfico vacuolar. Estos rastreos buscaban mutantes que secretaban proteínas vacuolares o que tenían reducida la actividad proteolítica en las vacuolas (Coonrod and Stevens, 2010). Incluso se han realizado rastreos por genética reversa a nivel de todo el genoma de levaduras para buscar mutantes que secretaban proteínas vacuolares (Bonangelino et al., 2002). Estos rastreos en levaduras utilizaban un ensayo muy simple, determinado la secreción de proteínas vacuolares al medio de cultivo por western blot. Este tipo de ensayo es posible en organismos unicelulares, pero impracticable en organismos pluricelulares como las plantas. Para realizar el rastreo en plantas era necesario encontrar un marcador que produjese directamente un fenotipo fácilmente detectable al interferirse con su localización vacuolar. En el laboratorio se generó el marcador vacuolar VAC2 basado en la proteína CLV3 que es un regulador maestro del desarrollo del meristemo apical de tallo que actúa como ligando extracelular (Rojo et al., 2002). Se eligió una línea transgénica que expresaba muy altos niveles de VAC2, cercanos a límite de saturación del transporte a vacuolas. La predicción era que al ser secretado VAC2 provocaría una disminución en el tamaño de los meristemos apicales de tallo y de los meristemos florales. Esto se comprobó cruzando la línea VAC2 con los mutantes de las SNARE VTI11 y VTI12 que participan en tráfico a vacuolas en levaduras y plantas (Sanmartin et al., 2007; Surpin et al., 2003; Zheng et al., 1999). Aunque VTI11 y VTI12 tienen funciones y localizaciones distintas, en ausencia de una de ellas, la otra suple parcialmente su función trasladándose al otro complejo t-SNARE (Surpin et al., 2003), por lo que se podría hablar de redundancia funcional facultativa. El doble mutante *vti11/vti11 vti12/vti12* es letal, indicando que las actividades de VTI11 y/o VTI12 son esenciales para la viabilidad de *Arabidopsis*. La eficiencia del transporte de VAC2 es muy dependiente de la actividad VTI12 y en menor

DISCUSION

medida de VTI11 (Sanmartin et al., 2007). En ese trabajo se demostró la alta sensibilidad y el rango dinámico del ensayo basado en VAC2 para identificar mutantes de tráfico a vacuolas. Así el mutante *vti12*, que no tiene fenotipo a nivel macroscópico en ausencia del VAC2, ya que VTI11 suple su función, es fácilmente detectable con nuestro ensayo. Por otro lado, el mutante *vti11* que es agravitrópico y enano por estar afectada la biogénesis de la vacuola central (Surpin et al., 2003), muestra un ligerísimo, pero detectable, defecto en tráfico de VAC2, que es probablemente debido a que VTI12 tiene que suplir a VTI11 y su actividad resulta insuficiente para transportar todas la proteínas vacuolares. De hecho, distintas combinaciones de mutaciones en VTI11 y VTI12 afectan en distinto grado el transporte de VAC2, formando la siguiente serie alélica de secreción de VAC2: $vti11/vti11 \text{ VTI12/VTI12} < vti11/vti11 \text{ vti12/VTI12} \lll \text{VTI11/VTI11} \text{ vti12/vti12} < vti11/\text{VTI11} \text{ vti12/vti12}$ (Sanmartin et al., 2007).

Aunque estos resultados demostraban que el ensayo podía detectar secreción de VAC2 en mutantes analizados por genética reversa, no estaba claro cuál sería la eficiencia del ensayo en un escrutinio por genética directa y cuál sería la proporción de falsos positivos. Los falsos positivos podrían deberse a mutaciones que directamente causasen una disminución del tamaño del meristemo, al afectar genes como *SHOOTMERISTEMLESS* o *WUSCHEL* (Long et al., 1996; Mayer et al., 1998). Para eliminar este tipo de mutantes, consideramos sólo los mutantes en los que el fenotipo meristemático se diera en presencia del transgén VAC2 pero no en su ausencia. Otra fuente de posibles falsos positivos podrían ser condiciones de crecimiento que provocasen la saturación del tráfico a vacuolas o mutaciones que afectasen de una manera indirecta este tráfico. Para minimizar la posibilidad de obtener falsos positivos nos centramos en los mutantes *mtv* que mostrasen un fenotipo muy fuerte de terminación temprana del meristemo. En un primer rastreo encontramos los mutantes *mtv* fuertes *mtv1*, *mtv2*, *mtv3* y *mtv4*, tres de los cuales han sido analizados en este trabajo de tesis. La identificación de los genes mutados mostró que todos codifican para proteínas de familias implicadas en tráfico de membranas. Posteriormente se han clonado otros cinco mutantes *mtv* en el laboratorio y también han resultado ser proteínas implicadas en tráfico vesicular. Por tanto, hasta el momento no hemos obtenido ningún falso positivo en este rastreo. Además, muchos de los mutantes aislados no presentan fenotipos evidentes de desarrollo en ausencia del transgén VAC2 y sólo se empiezan a observar estos cuando se les combina con otras mutaciones como en el caso de *mtv1* y *mtv4*. Por otro lado, en los mutantes encontrados, el bloqueo en el tráfico de proteínas vacuolares endógenas es parcial y en algunos casos casi imperceptible. Esto indica que nuestro rastreo es muy sensible y detecta perturbaciones muy débiles en el tráfico vacuolar. El hecho de que no hayamos identificado mutantes con un

DISCUSION

bloqueo mayor del tráfico a vacuola es probablemente debido a la redundancia funcional que hay en muchas de las familias que codifican la maquinaria de tráfico, como es el caso de los genes *VTI11* y *VTI12* (Sanmartin et al., 2007) de *VSR1*, *VSR3* y *VSR4* (Zouhar et al., 2010) o de *PTEN2a* y *PTEN2b* (este trabajo). Además, en los casos en los que no haya redundancia, el bloqueo total en el tráfico a vacuolas sería probablemente letal, como en el caso del mutante *vacuoleless1* (Rojo et al., 2001) y por tanto estos mutantes no serían recuperados en nuestro rastreo.

2. Las vesículas recubiertas de clatrina median transporte de proteínas entre el TGN y el PVC

El TGN y el endosoma temprano son orgánulos independientes y secuenciales en la ruta biosintética en animales y hongos. El endosoma temprano o endosoma de reciclaje en estos organismos recoge las proteínas de la ruta biosintética y endocítica y recicla aquellas que han de ser devueltas al TGN en vesículas del retrómero y las que han de ser devueltas a la membrana plasmática en vesículas secretoras. El resto del endosoma temprano madura para formar el cuerpo multivesicular o PVC que posteriormente se fusiona con la vacuola. Por tanto, se considera que en animales y hongos el transporte de proteínas a vacuola requiere un paso de tráfico vesicular entre el TGN y el endosoma temprano, pero no después de que las proteínas alcancen este último compartimento. Se han presentado evidencias de que el TGN en plantas es el puerto de entrada de la ruta endocítica por lo que se considera que el TGN y el endosoma temprano son un mismo compartimento en estos organismos (Dettmer et al., 2006). Por analogía con los sistemas animales y de hongos, el tráfico entre el TGN/endosoma temprano y el PVC podría por tanto implicar transporte vesicular o maduración de compartimentos. De hecho, hay datos contradictorios sobre la localización del retrómero entre el PVC y el TGN (Robinson and Pimpl, 2014). La localización en el PVC apoya la idea de que hay transporte vesicular anterógrado y retrogrado entre el TGN y el PVC en las plantas (Nodzynski et al., 2013; Oliviussen et al., 2006) y que por tanto no existe maduración de un compartimento en otro. Además, se ha descrito que existe un compartimento posterior al PVC que sería el que se fusionaría con la vacuola, una vez que se hubieran reciclado los componentes desde el PVC al TGN por el retrómero (Foresti et al., 2010). Por otro lado, la localización del retrómero en el TGN se ha propuesto como un indicio de que desde el TGN se reciclan componentes hacia el RE (Niemes et al., 2010b), donde las proteínas vacuolares serían

DISCUSION

seleccionadas por los receptores VSR para su transporte vesicular al Golgi y TGN (Niemes et al., 2010a), que posteriormente maduraría para formar el PVC (Scheuring et al., 2011). Sin embargo, las evidencias que indican que la selección de proteínas vacuolares se realiza en el Golgi/TGN y de que las proteínas vacuolares y los receptores VSR abandonan el TGN en vesículas son muy sólidas (Gershlick et al., 2014; Hillmer et al., 2001; Hinz et al., 2007; Hinz et al., 1999; Otegui et al., 2006).

Estos modelos contradictorios están principalmente basados en observaciones de microscopía y no había prácticamente evidencias genéticas que permitieran discernir cuál de ellos es correcto. Los resultados de este trabajo de tesis aportan evidencias funcionales que apoyan firmemente que el transporte de proteínas desde el TGN al PVC requiere vesículas recubiertas de clatrina. MTV1 y MTV4 participarían en la formación de estas CCVs mediante la interacción directa con clatrina y posiblemente con sus complejos adaptadores..

En plantas se han detectado cuatro tipos diferentes de complejos adaptadores de clatrina (AP-1 a AP-4), que son los organizadores centrales que median el reconocimiento de las proteínas cargo en las vesículas (Robinson and Pimpl, 2014). Cada complejo AP se compone de cuatro subunidades llamados adaptinas; 2 subunidades grandes $\alpha/\gamma/\delta/\epsilon/$ y las subunidades $\beta 1-\beta 4$; una subunidad media $\mu 1-\mu 4$ y una subunidad pequeña $\sigma 1-\sigma 4$. El complejo AP-1 actúa en la formación de vesículas en el TGN dirigidas hacia el PVC (Park et al., 2013; Wang et al., 2014). El complejo AP-2 está involucrado en la endocitosis desde la MP (Fan et al., 2013). Los complejos AP-3 y AP-4 podrían tener un papel funcional en la ruta desde el TGN a la vacuola (Gershlick et al., 2014).

MTV4/AGD5 activa en el TGN la GTPasa ARF1 (Stefano et al., 2010), que interacciona con el complejo adaptador de clatrina AP-1, sugiriendo que MTV4 participa en la ruta canónica de transporte entre el TGN y el PVC. *MTV1* es un gen único en plantas que se diferencia claramente de las otras proteínas con dominios ENTH implicadas en el tráfico vacuolar en *Arabidopsis* (Figura 35). *MTV1* no tiene homólogos claros en hongos, pero sí en animales. El homólogo más cercano a *MTV1* en animales es Tepsina, que es la primera proteína accesoria conocida del complejo adaptador AP-4 (Borner et al., 2012) que participa también en el transporte desde el TGN a la vacuola (Hirst et al., 2012).

DISCUSION

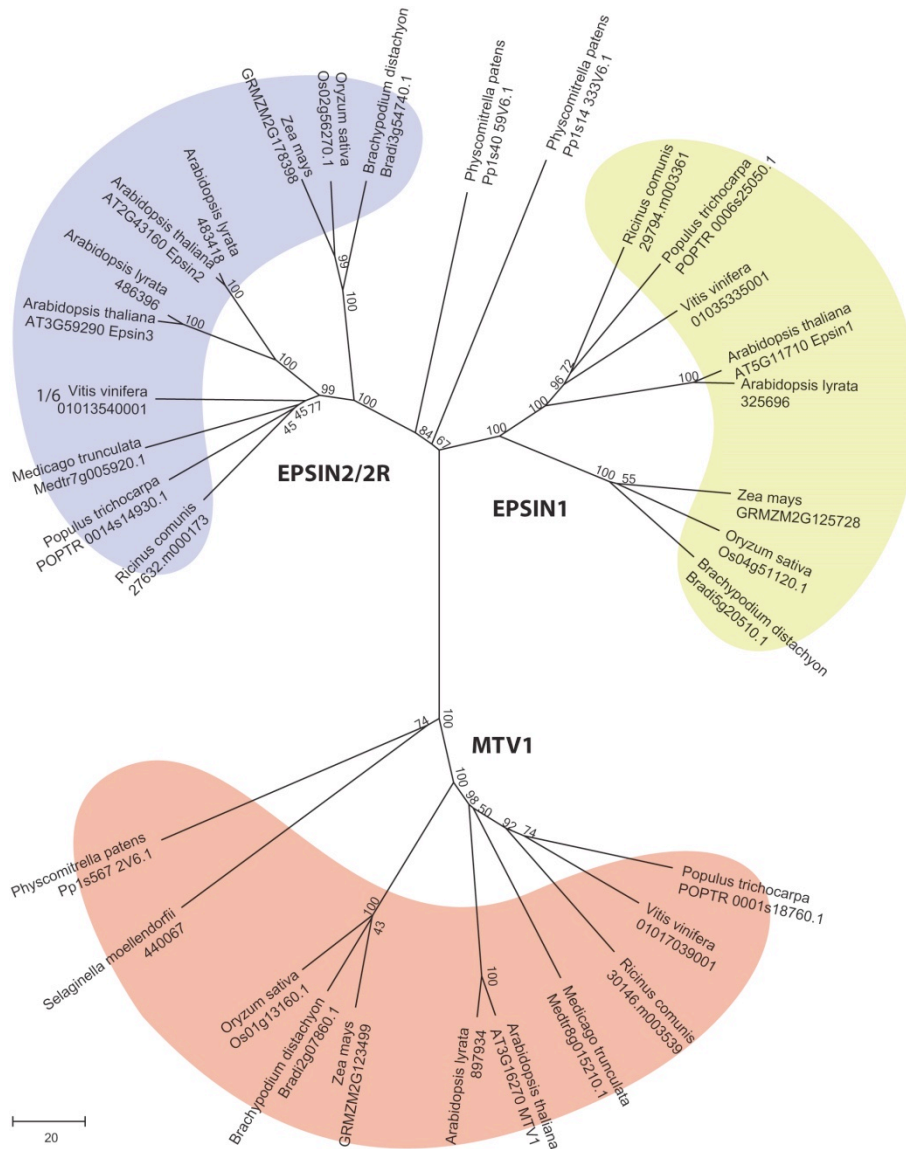


Figura 35. Análisis filogenético de MTV1 y las proteínas con dominio ENTH Epsin1, Epsin2 y Epsin 3 en plantas.

Se alinearon las secuencias de las proteínas completas usando el algoritmo Muscle. El análisis de proximidad muestra claramente 3 subgrupos. La longitud de las ramas indica distancia filogenética y el número en el nodo muestra el valor de arranque (*Bootstrap value*).

Los complejos AP-1 y AP-4 participan en rutas paralelas de tráfico entre el TGN y el PVC, por lo que es posible que MTV4 y MTV1 estén implicados en rutas independientes de tráfico. La ruta AP-4 es considerada una ruta minoritaria relativa a la ruta AP-1. Esto podría explicar por qué el fenotipo del mutante *mtv1* es relativamente débil, a pesar de ser aparentemente un gen de copia única en Arabidopsis. Se ha especulado que la ruta AP-4 podría estar implicada en el

DISCUSION

transporte de proteínas específicas, pero también hay evidencias de que es una ruta paralela que transportaría el mismo tipo de cargo que la ruta AP-1 (Hirst et al., 2012), lo que es consistente con el efecto sinérgico que se observa al combinar las mutaciones *mtv1* y *mtv4*. Además se ha reportado en mamíferos que la ruta AP-4 se activa cuando la ruta AP-1 no funciona adecuadamente (Hirst et al., 2012). Sería interesante determinar si este fenómeno ocurre en plantas, y en particular determinar si en el mutante *mtv4* aumenta la actividad de la ruta AP-4. En este sentido, es posible que el cambio en el patrón de distribución de VSRs en gradientes de sacarosa hacia fracciones más densas en el mutante *agd5* refleje un mayor flujo a través de una ruta dependiente de MTV1 y AP-4. Si efectivamente MTV1 participa en la ruta dependiente de AP-4, nuestros resultados pueden aportar información muy valiosa para entender cómo se forman las vesículas que contienen este complejo adaptador. Está ampliamente aceptado que las vesículas AP-4 no contienen clatrina pero se desconoce si tienen una cubierta alternativa (Boehm and Bonifacino, 2001; Park and Guo, 2014). Es importante resaltar que los datos que apoyan la hipótesis de que las vesículas AP-4 no contienen clatrina son escasos e indirectos. En un artículo de 1999 el grupo del Dr. Bonifacino reportó que AP-4 no estaba enriquecido en fracciones purificadas de CCVs y que no se detectaba interacción directa entre AP-4 y clatrina (Dell'Angelica et al., 1999). Sin embargo, en estudios posteriores sí que se ha encontrado AP-4 asociado a CCVs (Barois and Bakke, 2005; Borner et al., 2012). Por otro lado, MTV1 podría funcionar como un intermediario que interactuase con clatrina y AP-4, conectando ambos complejos. Esto explicaría la falta de interacción directa entre AP-4 y clatrina (Dell'Angelica et al., 1999). Será por tanto fundamental analizar si MTV1 interacciona con AP-4. Además, habría que analizar si AP-4 está presente en las fracciones de CCVs purificadas que contienen a MTV1 y MTV4, y, en ese caso, si colocalizan en vesículas con MTV1 pero no con MTV4.

La homeostasis de fosfoinosítidos es fundamental para el transporte eficiente a vacuolas

Los fosfoinosítidos marcan de forma diferencial los distintos compartimentos del sistema de endomembranas y son fundamentales para reclutar específicamente muchas de las proteínas implicadas en tráfico vesicular. Por ello, no es sorprendente que en nuestro rastreo de mutantes, entre los primeros 8 genes *mtv* identificados, 3 están directamente relacionados con los fosfoinosítidos. MTV1 tiene un dominio ENTH de unión a fosfoinosítidos, mientras que

DISCUSION

MTV3 (este trabajo) y MTV11 están directamente implicados en modificar los fosfoinosítidos de membrana. *MTV11* codifica para una quinasa activadora de la PI3 quinasa VPS34 (Ruano y Rojo, sin publicar). *MTV3* codifica para la fosfatasa de fosfoinosítidos PTEN2a que defosforila *in vitro* el grupo 3' fosfato del PI3P (phosphatidilinositol 3-fosfato), del PI(3,4)P2 (phosphatidilinositol 3,4-bisfosfato) y del PI(3,5)P2 (phosphatidilinositol 3,5-bisfosfato) (Pribat et al., 2012). Además, MTV3 presenta afinidad por fosfolípidos *in vitro*, incluido por PI3P, si bien muestra mayor afinidad por el fosfatidilinositol en estos ensayos. Las membranas de los endosomas en la ruta a la vacuola están marcadas preferentemente por fosfoinosítidos fosforilados en posición 3', mientras que las membranas de la ruta de secreción están enriquecidas en fosfoinosítidos defosforilados en esa posición. La alteración de la actividad de MTV3 por pérdida de función en los mutantes *mtv3-1* y *mtv3-2 pten2b-1* puede resultar en un aumento de la fosforilación en posición 3' en la ruta de secreción y provocar la desviación de parte del cargo hacia la membrana plasmática. Por otro lado, la ganancia de función en las plantas que sobreexpresan *MTV3* puede provocar una defosforilación en posición 3' en la ruta vacuolar, lo que produciría defectos en la localización de la maquinaria de transporte y posteriormente la secreción de proteínas vacuolares por la ruta por defecto (Denecke et al., 1990). Este escenario es consistente con las alteraciones que observamos en la localización de la SNARE VTI12 en las plantas que sobreexpresan MTV3-GFP. Las proteínas SNARE están conservadas en todos los organismos eucariotas (Scales et al., 2000) y catalizan la fusión de membranas entre el intermediario de transporte y el compartimento de destino. La interacción específica entre las SNARE presentes en la membrana de origen (v-SNAREs) y el complejo t-SNARE en la membrana de destino aporta especificidad (McNew et al., 2000) y probablemente energía para el proceso de fusión. VTI12 forma parte de un complejo t-SNARE en el TGN con las syntaxinas SYP41/SYP42 y SYP61 (Sanderfoot et al., 2001). Su localización en un complejo t-SNARE en el TGN indica que probablemente está implicada en el tráfico retrogrado para reciclar receptores y otros componentes de la ruta vacuolar. Sin embargo, también se ha propuesto que el TGN en plantas podría recibir vesículas en sentido anterógrado desde el Golgi o el RE (Robinson and Pimpl, 2014), por lo que no es descartable que VTI12 esté implicada en la fusión de vesículas en sentido anterógrado en el TGN. Por otro lado, en levadura existe un único gen *VTI*, que participa en las dos rutas de transporte desde el TGN a vacuola descritas en este organismo. El gen *VTI11* de *Arabidopsis* complementa en levaduras la ruta mediada por AP-1, mientras que el gen *VTI12* complementa la ruta dependiente del complejo adaptador AP-3 (Zheng et al., 1999). Por tanto, es posible que VTI12 participe en la ruta mediada por AP-3 desde TGN a vacuola descrita en plantas (Feraru et al., 2010; Niihama

DISCUSION

et al., 2009; Wolfenstetter et al., 2012; Zwiewka et al., 2011) y que la sobreexpresión de *MTV3* afecte específicamente el transporte a través de esta ruta.

La deslocalización de VTI12 en las plantas que sobreexpresan *MTV3* correlaciona con una alteración en la distribución del marcador de PI3P YFP 2xFYVE, sugiriendo que, en efecto, es debida a alteraciones en los fosfoinosítidos de membrana. De hecho, estas plantas muestran cambios en la localización de 2xFYVE que son muy similares a los que se producen al inhibir la PI3 quinasa con wortmanina, incluyendo un agrandamiento del PVC, lo que apoya que los fenotipos observados son causados por la sobre activación de la fosfatasa y las subsecuentes alteraciones en el perfil de fosfoinosítidos en las membranas. Además, nuestros datos muestran que la sobreexpresión de *MTV3* y YFP 2xFYVE altera la autofagia y la senescencia, lo que concuerda con la implicación del PI3P en este proceso, mediando el reclutamiento de ATG21 y la biogénesis del autofagosoma (Juris et al., 2015). Será muy interesante estudiar si estos cambios alteran respuestas que implican autofagia, como puede ser la defensa frente a ciertos patógenos (Hayward et al., 2009; Kim et al., 2012; Lai et al., 2011).

Rutas de tráfico a vacuolas en plantas

Se han descrito numerosas rutas de tráfico de proteínas a vacuolas en plantas en la vía biosintética. En algunos casos las proteínas se transportan a vacuolas directamente desde el RE sin pasar por el AG (Herman and Schmidt, 2004). Aunque en mamíferos también podrían existir vías directas desde el RE a los lisosomas (Noda and Farquhar, 1992), estas son mucho más prevalentes en plantas, en especial en tejidos de semillas. En cotiledones en desarrollo de calabaza y ricino se han descrito las vesículas PAC ("precursor accumulating vesicles") derivadas directamente del RE que transportan proteínas de reserva a la vacuola (Hara-Nishimura et al., 1998; Mitsunashi et al., 2001). En semillas de leguminosas en germinación y en raíces de *Arabidopsis* se han descrito vesículas derivadas del RE que transportan hidrolasas a las vacuolas de reserva para activar la digestión de las proteínas necesaria para el crecimiento de la plántula (Rojo et al., 2004; Rojo et al., 2003a; Schmid et al., 2001; Toyooka et al., 2000).

Sin embargo, la mayoría de las proteínas vacuolares atraviesan el Golgi donde son modificadas, seleccionadas y separadas del resto de proteínas para su transporte a vacuolas.

DISCUSION

De hecho, los receptores de direccionamiento vacuolar conocidos (VSR y RMRs) se localizan en el Golgi, y en el caso de los VSR ciclan entre este compartimento y el PVC. Sin embargo, existen bastantes discrepancias en cómo las proteínas salen del Golgi/TGN para ser transportadas al PVC y posteriormente a la vacuola. Hay muchas evidencias de que el transporte entre el TGN y el PVC está mediado por vesículas, aunque otros autores defienden que este proceso no requiere transporte vesicular sino maduración del TGN para formar el PVC (Scheuring et al., 2011), si bien para este último modelo existen pocas evidencias funcionales y que lo apoyen. Estudios, principalmente en modelos de semillas de leguminosas y en *Arabidopsis*, han descrito dos tipos de vesículas que mediarían el transporte entre TGN y el PVC: las CCVs y las DVs. Las DVs parecen ser específicas de semillas y estarían especializadas en transportar proteínas de reserva como las vicilinas, las leguminas y las napinas, mientras que las CCVs tendrían una distribución más global, aunque su contenido no está bien caracterizado (Zouhar and Rojo, 2009). Se ha reportado que los VSRs y por ende sus cargos, que incluyen proteínas de reserva e hidrolasas, se localizarían en CCVs (Ahmed et al., 2000; Hinz et al., 2007), aunque otros autores encontraron los VSRs en DVs (Otegui et al., 2006). En semillas de leguminosas y de *Arabidopsis*, la selección y separación de las proteínas vacuolares que serán empaquetadas en CCVs y en DVs parece empezar ya en el AG. Las proteínas dirigidas a DVs, incluyendo los posibles receptores RMR, se segregan a la periferia de las cisternas donde forman agregados electrónicamente densos y son empaquetadas en DVs en la zona trans del Golgi (Hinz et al., 2007; Hinz et al., 1999; Hohl et al., 1996; Otegui et al., 2006). Estos agregados podrían dar lugar a la formación de DVs por deformación de la membrana desde el lumen (Hinz et al., 2007; Shen et al., 2011). Además estas DVs podrían fusionarse con un PVC específico antes de su descarga en la vacuola (Shen et al., 2011), o en un PVC común a las otras rutas vacuolares (Otegui et al., 2006).

La naturaleza de las DVs y de los cargos de las CCVs no están bien caracterizados (Hinz et al., 2007; Otegui et al., 2006). Las DVs muestran a menudo una cubierta parcial de clatrina, lo que se ha interpretado como que se podrían originar CCVs a partir de las DVs para extraer proteínas que hubiesen sido erróneamente empaquetadas en las vesículas. Sin embargo, también es posible que esa clatrina puede ser parte de la cubierta de las DVs, que constituirían un tipo especial de CCVs de mayor tamaño. Para resolver cómo se forman, qué contenido tienen y qué ruta siguen las diversas vesículas formadas en el TGN para llegar a la vacuola, es necesario identificar la maquinaria implicada en su formación. En este trabajo hemos identificado tres proteínas localizadas en el TGN relacionadas con clatrina que podrían participar en tres rutas de transporte vesicular paralelas entre el TGN y el PVC (Figura 36).

DISCUSION

MTV1 y MTV4 son proteínas con funciones directamente relacionadas con la formación de vesículas. MTV4 es una ARF-GAP que funcionaría como mediador entre los receptores de carga y la cubierta de las vesículas. MTV4 interacciona con clatrina y Arf1, que a su vez interacciona con el complejo AP-1 para formar CCVs en la ruta canónica de TGN a vacuola. MTV1 es una proteína ENTH que funciona como adaptador de clatrina y es homóloga a Tepsina, que interacciona con AP-4. MTV4 por tanto podría participar en formación de vesículas AP-4 que podrían contener clatrina.

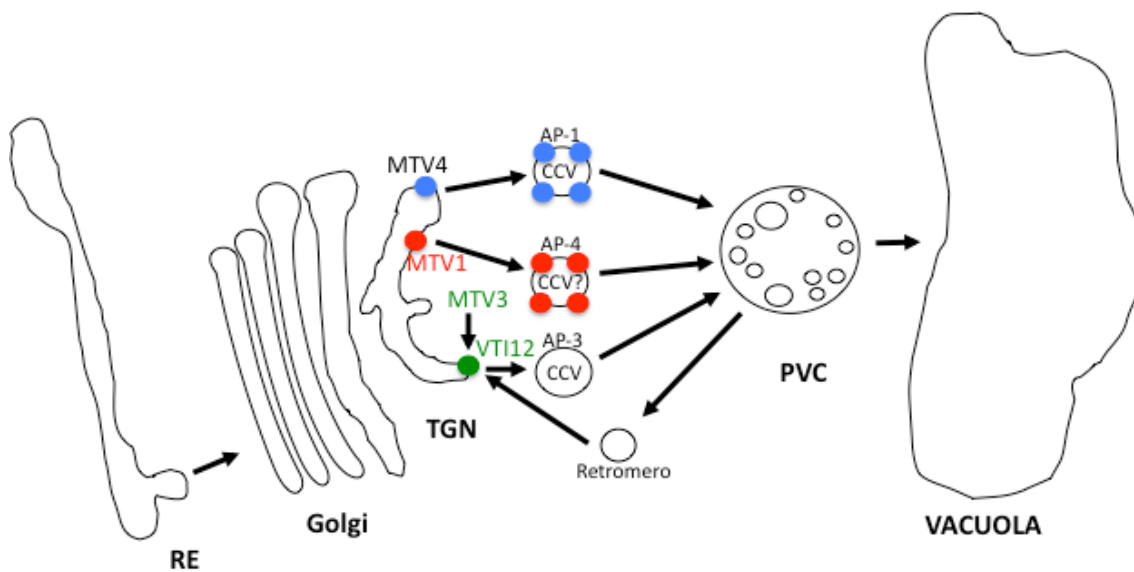


Figura 36. Modelo de la función de MTV1, MTV3 y MTV4 en el transporte a vacuolas.

Las proteínas MTV1 y MTV4, que posiblemente funcionan como adaptadoras de clatrina, se localizan en el TGN y en CCVs. MTV4 interacciona con ARF1 que a su vez interacciona con AP-1 en la ruta canónica de TGN a PVC mediada por CCVs. MTV1 es homólogo a Tepsina que interacciona con AP-4, por lo que hemos situado a MTV1 en esta ruta, que posiblemente también sea mediada por CCVs. MTV3 regula el patrón de fosfoinosítidos en las membranas y es necesario para la correcta localización de VTI12 en el TGN. A su vez VTI12 sería necesario para la fusión de vesículas del retrómero con el TGN o para el transporte anterógrado dependiente de AP-3 en CCVs.

Por último MTV3 regula la localización de VTI12, que es capaz de complementar el defecto en la ruta AP-3 del mutante de levaduras *vti1p*. Por tanto MTV3 podría estar implicado en la formación de CCVs en la ruta AP-3. La existencia de rutas independientes es consistente con los fenotipos débiles de los mutantes simples *mtv* y con la exacerbación de los fenotipos

DISCUSION

cuando se obtienen dobles mutantes. Será interesante determinar si alguna de estas vesículas (AP-1, AP-3 o AP-4) se corresponde con las vesículas DVs de las que hasta el momento solo se conoce su morfología en imágenes de microscopía electrónica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El rastreo de mutantes *mtv* que secretan el marcador vacuolar VAC2 es altamente sensible y eficiente para identificar genes implicados en tráfico de proteínas vacuolares en plantas por genética directa.
2. Las mutantes *mtv1-1* y *mtv4-1* son alelos nulos, lo que indica que los respectivos genes son necesarios para el transporte de proteínas a vacuola.
3. El gen *MTV1* codifica para una proteína con un dominio ENTH de unión a fosfoinosítidos y *MTV4* para una proteína activadora de ARF GTPasas, en ambos casos son proteínas de familias implicadas en la formación de vesículas.
4. *MTV1* y *MTV4* co-localizan en un dominio específico del TGN junto a clatrina y cooperan genéticamente en el transporte de proteínas vacuolares endógenas y en el desarrollo de la planta.
5. *MTV1* y *MTV4* interaccionan con clatrina y están presentes en las vesículas recubiertas de clatrina.
6. El doble mutante *mtv1 mtv4* presenta alteraciones en la morfología del TGN y alteraciones en la distribución de los receptores de direccionamiento vacuolar VSRs, sugiriendo que *MTV1* y *MTV4* participan en la formación de vesículas recubiertas de clatrina en el TGN.
7. El mutante *mtv3-1* tiene una mutación puntual en la fosfatasa de fosfoinosítidos PTEN2a que causa una pérdida de función codominante.
8. Los mutantes simples en los alelos nulos *mtv3-2* y *pten2b-2* no tienen defectos en secreción mientras que el doble mutante *mtv3-2 pten2b-2* causa la secreción de VAC2, sugiriendo que el alelo *mtv3-1* interfiere con la función de *MTV3* silvestre y con su parálogo PTEN2b.
9. *MTV3* se distribuye entre el citosol y el TGN y la mutación *mtv3-1* disminuye su asociación con membranas.
10. La sobreexpresión de *MTV3* fusionado a GFP causa defectos en el tráfico de proteínas vacuolares, aumento de los niveles de VSRs, acumulación en la vacuolas de proteínas de otros compartimentos y la aceleración de la autofagia y la senescencia.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wisniewska, J., Moulinier-Anzola, J. C., Sieberer, T., Friml, J., and Luschign, C. (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* 8, 249-256.
- Ahmed, S. U., Bar-Peled, M., and Raikhel, N. V. (1997). Cloning and subcellular location of an Arabidopsis receptor-like protein that shares common features with protein-sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol* 114, 325-336.
- Ahmed, S. U., Rojo, E., Kovaleva, V., Venkataraman, S., Dombrowski, J. E., Matsuoka, K., and Raikhel, N. V. (2000). The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in Arabidopsis thaliana. *J Cell Biol* 149, 1335-1344.
- Barois, N., and Bakke, O. (2005). The adaptor protein AP-4 as a component of the clathrin coat machinery: a morphological study. *Biochem J* 385, 503-510.
- Bassham, D. C., Brandizzi, F., Otegui, M. S., and Sanderfoot, A. A. (2008). The secretory system of Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 6, e0116.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.
- Boehm, M., and Bonifacino, J. S. (2001). Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* 12, 2907-2920.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M., and Bonifacino, J. S. (2002). Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 2486-2501.
- Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166.
- Borner, G. H., Antrobus, R., Hirst, J., Bhumbra, G. S., Kozik, P., Jackson, L. P., Sahlender, D. A., and Robinson, M. S. (2012). Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles. *J Cell Biol* 197, 141-160.
- Clary, D. O., Griff, I. C., and Rothman, J. E. (1990). SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709-721.
- Contreras, I., Ortiz-Zapater, E., Castilho, L. M., and Aniento, F. (2000). Characterization of Cop I coat proteins in plant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 176-182.
- Contreras, I., Yang, Y., Robinson, D. G., and Aniento, F. (2004). Sorting signals in the cytosolic tail of plant p24 proteins involved in the interaction with the COPII coat. *Plant Cell Physiol* 45, 1779-1786.
- Coonrod, E. M., and Stevens, T. H. (2010). The yeast vps class E mutants: the beginning of the molecular genetic analysis of multivesicular body biogenesis. *Mol Biol Cell* 21, 4057-4060.
- De Marcos Lousa, C., Gershlick, D. C., and Denecke, J. (2012). Mechanisms and concepts paving the way towards a complete transport cycle of plant vacuolar sorting receptors. *Plant Cell* 24, 1714-1732.
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., and Bonifacino, J. S. (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* 274, 7278-7285.
- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M., and Bonifacino, J. S. (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 149, 81-94.
- Denecke, J., Aniento, F., Frigerio, L., Hawes, C., Hwang, I., Mathur, J., Neuhaus, J. M., and Robinson, D. G. (2012). Secretory pathway research: the more experimental systems the better. *Plant Cell* 24, 1316-1326.
- Denecke, J., Botterman, J., and Deblaere, R. (1990). Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* 2, 51-59.

BIBLIOGRAFÍA

- Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y. D., and Schumacher, K. (2006). Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 715-730.
- Donohoe, B. S., Kang, B. H., Gerl, M. J., Gergely, Z. R., McMichael, C. M., Bednarek, S. Y., and Staehelin, L. A. (2013). Cis-Golgi cisternal assembly and biosynthetic activation occur sequentially in plants and algae. *Traffic* **14**, 551-567.
- Ebine, K., and Ueda, T. (2009). Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways. *J Plant Res* **122**, 21-30.
- Fan, L., Hao, H., Xue, Y., Zhang, L., Song, K., Ding, Z., Botella, M. A., Wang, H., and Lin, J. (2013). Dynamic analysis of Arabidopsis AP2 sigma subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development. *Development* **140**, 3826-3837.
- Feraru, E., Paciorek, T., Feraru, M. I., Zwiewka, M., De Groodt, R., De Rycke, R., Kleine-Vehn, J., and Friml, J. (2010). The AP-3 beta adaptin mediates the biogenesis and function of lytic vacuoles in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 2812-2824.
- Foresti, O., and Denecke, J. (2008). Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic* **9**, 1599-1612.
- Foresti, O., Gershlick, D. C., Bottanelli, F., Hummel, E., Hawes, C., and Denecke, J. (2010). A recycling-defective vacuolar sorting receptor reveals an intermediate compartment situated between prevacuoles and vacuoles in tobacco. *Plant Cell* **22**, 3992-4008.
- Frigerio, L., and Hawes, C. (2008). The endomembrane system: a green perspective. *Traffic* **9**, 1563.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., and Jurgens, G. (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.
- Geldner, N., Denervaud-Tendon, V., Hyman, D. L., Mayer, U., Stierhof, Y. D., and Chory, J. (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J* **59**, 169-178.
- Gershlick, D. C., Lousa Cde, M., Foresti, O., Lee, A. J., Pereira, E. A., daSilva, L. L., Bottanelli, F., and Denecke, J. (2014). Golgi-dependent transport of vacuolar sorting receptors is regulated by COPII, AP1, and AP4 protein complexes in tobacco. *Plant Cell* **26**, 1308-1329.
- Happel, N., Honing, S., Neuhaus, J. M., Paris, N., Robinson, D. G., and Holstein, S. E. (2004). Arabidopsis mu A-adaptin interacts with the tyrosine motif of the vacuolar sorting receptor VSR-PS1. *Plant J* **37**, 678-693.
- Hara-Nishimura, I., and Hatsugai, N. (2011). The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ* **18**, 1298-1304.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., and Nishimura, M. (1998). Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**, 825-836.
- Hayward, A. P., Tsao, J., and Dinesh-Kumar, S. P. (2009). Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 1041-1047.
- Herman, E., and Schmidt, M. (2004). Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol* **136**, 3440-3446.
- Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D. G., and Hinz, G. (2001). Vacuolar storage proteins are sorted in the cis-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *J Cell Biol* **152**, 41-50.
- Hinz, G., Colanesi, S., Hillmer, S., Rogers, J. C., and Robinson, D. G. (2007). Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing Arabidopsis embryos. *Traffic* **8**, 1452-1464.
- Hinz, G., Hillmer, S., Baumer, M., and Hohl, I. I. (1999). Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell* **11**, 1509-1524.

BIBLIOGRAFÍA

- Hirst, J., Irving, C., and Borner, G. H. (2012). Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. *Traffic* *14*, 153-164.
- Hohl, I., Robinson, D. G., Chrispeels, M. J., and Hinz, G. (1996). Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J Cell Sci* *109* (Pt 10), 2539-2550.
- Holstein, S. E., and Oliviuss, P. (2005). Sequence analysis of *Arabidopsis thaliana* E/ANTH-domain-containing proteins: membrane tethers of the clathrin-dependent vesicle budding machinery. *Protoplasma* *226*, 13-21.
- Hunter, P. R., Craddock, C. P., Di Benedetto, S., Roberts, L. M., and Frigerio, L. (2007). Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol* *145*, 1371-1382.
- Hwang, I., and Robinson, D. G. (2009). Transport vesicle formation in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* *12*, 660-669.
- Ito, E., Fujimoto, M., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T., and Nakano, A. (2012). Dynamic behavior of clathrin in *Arabidopsis thaliana* unveiled by live imaging. *Plant J* *69*, 204-216.
- Juris, L., Montino, M., Rube, P., Schlotterhose, P., Thumm, M., and Krick, R. (2015). PI3P binding by Atg21 organises Atg8 lipidation. *Embo J* *34*, 955-973.
- Kim, S. H., Kwon, C., Lee, J. H., and Chung, T. (2012). Genes for plant autophagy: functions and interactions. *Mol Cells* *34*, 413-423.
- Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 187-198.
- Kirsch, T., Paris, N., Butler, J. M., Beevers, L., and Rogers, J. C. (1994). Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3403-3407.
- Konopka, C. A., Backues, S. K., and Bednarek, S. Y. (2008). Dynamics of *Arabidopsis* dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. *Plant Cell* *20*, 1363-1380.
- Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B., and Chen, Z. (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* *66*, 953-968.
- Langhans, M., Forster, S., Helmchen, G., and Robinson, D. G. (2011). Differential effects of the brefeldin A analogue (6R)-hydroxy-BFA in tobacco and *Arabidopsis*. *J Exp Bot* *62*, 2949-2957.
- Langhans, M., Meckel, T., Kress, A., Lerich, A., and Robinson, D. G. (2012). ERES (ER exit sites) and the "secretory unit concept". *J Microsc* *247*, 48-59.
- Lee, G. J., Kim, H., Kang, H., Jang, M., Lee, D. W., Lee, S., and Hwang, I. (2007). EpsinR2 interacts with clathrin, adaptor protein-3, AtVTI12, and phosphatidylinositol-3-phosphate. Implications for EpsinR2 function in protein trafficking in plant cells. *Plant Physiol* *143*, 1561-1575.
- Li, L., Shimada, T., Takahashi, H., Koumoto, Y., Shirakawa, M., Takagi, J., Zhao, X., Tu, B., Jin, H., Shen, Z., *et al.* (2013). MAG2 and three MAG2-INTERACTING PROTEINS form an ER-localized complex to facilitate storage protein transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* *76*, 781-791.
- Liljegren, S. J., Leslie, M. E., Darnielle, L., Lewis, M. W., Taylor, S. M., Luo, R., Geldner, N., Chory, J., Randazzo, P. A., Yanofsky, M. F., and Ecker, J. R. (2009). Regulation of membrane trafficking and organ separation by the NEVERSHED ARF-GAP protein. *Development* *136*, 1909-1918.
- Liu, J. X., and Howell, S. H. (2010). Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* *22*, 2930-2942.
- Liu, Y., and Li, J. (2014). Endoplasmic reticulum-mediated protein quality control in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* *5*, 162.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I., and Barton, M. K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* *379*, 66-69.
- Lopez-Mendez, B., Pantoja-Uceda, D., Tomizawa, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Shirouzu, M., Terada, T., Inoue, M., Yabuki, T., Aoki, M., *et al.* (2004). NMR assignment of the hypothetical ENTH-VHS domain At3g16270 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biomol NMR* *29*, 205-206.

BIBLIOGRAFÍA

- Luo, F., Fong, Y. H., Zeng, Y., Shen, J., Jiang, L., and Wong, K. B. (2014). How vacuolar sorting receptor proteins interact with their cargo proteins: crystal structures of apo and cargo-bound forms of the protease-associated domain from an Arabidopsis vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* 26, 3693-3708.
- Marti, L., Fornaciari, S., Renna, L., Stefano, G., and Brandizzi, F. (2010). COPII-mediated traffic in plants. *Trends Plant Sci* 15, 522-528.
- Matsuoka, K., Bassham, D. C., Raikhel, N. V., and Nakamura, K. (1995). Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* 130, 1307-1318.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95, 805-815.
- McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T. H., and Rothman, J. E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407, 153-159.
- Memon, A. R. (2004). The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *Biochim Biophys Acta* 1664, 9-30.
- Mitsuhashi, N., Hayashi, Y., Koumoto, Y., Shimada, T., Fukasawa-Akada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2001). A novel membrane protein that is transported to protein storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* 13, 2361-2372.
- Montesinos, J. C., Pastor-Cantizano, N., Robinson, D. G., Marcote, M. J., and Aniento, F. (2014). Arabidopsis p24delta5 and p24delta9 facilitate Coat Protein I-dependent transport of the K/HDEL receptor ERD2 from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Plant J* 80, 1014-1030.
- Morita, M. T., and Shimada, T. (2014). The plant endomembrane system--a complex network supporting plant development and physiology. *Plant Cell Physiol* 55, 667-671.
- Natsume, W., Tanabe, K., Kon, S., Yoshida, N., Watanabe, T., Torii, T., and Satake, M. (2006). SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 17, 2592-2603.
- Neuhaus, J. M., and Rogers, J. C. (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* 38, 127-144.
- Niemes, S., Labs, M., Scheuring, D., Krueger, F., Langhans, M., Jesenofsky, B., Robinson, D. G., and Pimpl, P. (2010a). Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER. *Plant J* 62, 601-614.
- Niemes, S., Langhans, M., Viotti, C., Scheuring, D., San Wan Yan, M., Jiang, L., Hillmer, S., Robinson, D. G., and Pimpl, P. (2010b). Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. *Plant J* 61, 107-121.
- Niihama, M., Takemoto, N., Hashiguchi, Y., Tasaka, M., and Morita, M. T. (2009). ZIP genes encode proteins involved in membrane trafficking of the TGN-PVC/vacuoles. *Plant Cell Physiol* 50, 2057-2068.
- Noda, T., and Farquhar, M. G. (1992). A non-autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosomes. *J Cell Biol* 119, 85-97.
- Nodzynski, T., Feraru, M. I., Hirsch, S., De Rycke, R., Niculaes, C., Boerjan, W., Van Leene, J., De Jaeger, G., Vanneste, S., and Friml, J. (2013). Retromer subunits VPS35A and VPS29 mediate prevacuolar compartment (PVC) function in Arabidopsis. *Mol Plant* 6, 1849-1862.
- Oliviusson, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y. C., Jiang, L., and Robinson, D. G. (2006). Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in Arabidopsis, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell* 18, 1239-1252.
- Orci, L., Ravazzola, M., Volchuk, A., Engel, T., Gmachl, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H., and Rothman, J. E. (2000). Anterograde flow of cargo across the golgi stack potentially mediated via bidirectional "percolating" COPI vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10400-10405.

BIBLIOGRAFÍA

- Otegui, M. S., Herder, R., Schulze, J., Jung, R., and Staehelin, L. A. (2006). The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell* *18*, 2567-2581.
- Paris, N., Stanley, C. M., Jones, R. L., and Rogers, J. C. (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* *85*, 563-572.
- Park, M., Lee, D., Lee, G. J., and Hwang, I. (2005). AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J Cell Biol* *170*, 757-767.
- Park, M., Song, K., Reichardt, I., Kim, H., Mayer, U., Stierhof, Y. D., Hwang, I., and Jurgens, G. (2013). *Arabidopsis* mu-adaptin subunit AP1M of adaptor protein complex 1 mediates late secretory and vacuolar traffic and is required for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 10318-10323.
- Park, S. Y., and Guo, X. (2014). Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep* *34*.
- Paul, M. J., and Frigerio, L. (2007). Coated vesicles in plant cells. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 471-478.
- Pereira, C., Pereira, S., and Pissarra, J. (2014). Delivering of proteins to the plant vacuole--an update. *Int J Mol Sci* *15*, 7611-7623.
- Perez-Perez, J. M., Candela, H., and Micol, J. L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends Genet* *25*, 368-376.
- Perez-Sancho, J., Schapire, A. L., Botella, M. A., and Rosado, A. (2016). Analysis of Protein-Lipid Interactions Using Purified C2 Domains. *Methods Mol Biol* *1363*, 175-187.
- Petrucelli, S., Molina, M. I., Lareu, F. J., and Circosta, A. (2007). Two short sequences from amaranth 11S globulin are sufficient to target green fluorescent protein and beta-glucuronidase to vacuoles in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol Biochem* *45*, 400-409.
- Pribat, A., Sormani, R., Rousseau-Gueutin, M., Julkowska, M. M., Testerink, C., Joubes, J., Castroviejo, M., Laguerre, M., Meyer, C., Germain, V., and Rothan, C. (2012). A novel class of PTEN protein in *Arabidopsis* displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid. *Biochem J* *441*, 161-171.
- Reyes, F. C., Bueno, R., and Otegui, M. S. (2011). Plant endosomal trafficking pathways. *Curr Opin Plant Biol* *14*, 666-673.
- Robert, S., Chary, S. N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N. V., and Hicks, G. R. (2008). Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8464-8469.
- Robinson, D. G., and Pimpl, P. (2014). Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci* *19*, 134-139.
- Rojo, E., and Denecke, J. (2008). What is moving in the secretory pathway of plants? *Plant Physiol* *147*, 1493-1503.
- Rojo, E., Gillmor, C. S., Kovaleva, V., Somerville, C. R., and Raikhel, N. V. (2001). VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev Cell* *1*, 303-310.
- Rojo, E., Martin, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., Jin, H., Paneque, M., Sanchez-Serrano, J. J., Baker, B., *et al.* (2004). VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr Biol* *14*, 1897-1906.
- Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., and Fletcher, J. C. (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* *14*, 969-977.
- Rojo, E., Zouhar, J., Carter, C., Kovaleva, V., and Raikhel, N. V. (2003a). A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7389-7394.

BIBLIOGRAFÍA

- Rojo, E., Zouhar, J., Kovaleva, V., Hong, S., and Raikhel, N. V. (2003b). The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* *14*, 361-369.
- Sanderfoot, A. A., Ahmed, S. U., Marty-Mazars, D., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Marty, F., and Raikhel, N. V. (1998). A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in Arabidopsis roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9920-9925.
- Sanderfoot, A. A., Kovaleva, V., Bassham, D. C., and Raikhel, N. V. (2001). Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the Arabidopsis cell. *Mol Biol Cell* *12*, 3733-3743.
- Sanmartin, M., Ordonez, A., Sohn, E. J., Robert, S., Sanchez-Serrano, J. J., Surpin, M. A., Raikhel, N. V., and Rojo, E. (2007). Divergent functions of VTI12 and VTI11 in trafficking to storage and lytic vacuoles in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 3645-3650.
- Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F., Caboche, M., and Lepiniec, L. (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. *Plant J* *54*, 608-620.
- Sauer, M., Delgadillo, M. O., Zouhar, J., Reynolds, G. D., Pennington, J. G., Jiang, L., Liljegren, S. J., Stierhof, Y. D., De Jaeger, G., Otegui, M. S., *et al.* (2013). MTV1 and MTV4 encode plant-specific ENTH and ARF GAP proteins that mediate clathrin-dependent trafficking of vacuolar cargo from the trans-Golgi network. *Plant Cell* *25*, 2217-2235.
- Scales, S. J., Bock, J. B., and Scheller, R. H. (2000). The specifics of membrane fusion. *Nature* *407*, 144-146.
- Scheele, U., Alves, J., Frank, R., Duwel, M., Kalthoff, C., and Ungewickell, E. (2003). Molecular and functional characterization of clathrin- and AP-2-binding determinants within a disordered domain of auxilin. *J Biol Chem* *278*, 25357-25368.
- Schekman, R., and Novick, P. (2004). 23 genes, 23 years later. *Cell* *116*, S13-15, 11 p following S19.
- Scheuring, D., Viotti, C., Kruger, F., Kunzl, F., Sturm, S., Bubeck, J., Hillmer, S., Frigerio, L., Robinson, D. G., Pimpl, P., and Schumacher, K. (2011). Multivesicular bodies mature from the trans-Golgi network/early endosome in Arabidopsis. *Plant Cell* *23*, 3463-3481.
- Schmid, M., Simpson, D. J., Sarioglu, H., Lottspeich, F., and Gietl, C. (2001). The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 5353-5358.
- Shen, J., Ding, Y., Gao, C., Rojo, E., and Jiang, L. (2014). N-linked glycosylation of AtVSR1 is important for vacuolar protein sorting in Arabidopsis. *Plant J* *80*, 977-992.
- Shen, Y., Wang, J., Ding, Y., Lo, S. W., Gouzerh, G., Neuhaus, J. M., and Jiang, L. (2011). The rice RMR1 associates with a distinct prevacuolar compartment for the protein storage vacuole pathway. *Mol Plant* *4*, 854-868.
- Shewry, P. R., Napier, J. A., and Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* *7*, 945-956.
- Shimada, T., Fuji, K., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2003). Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 16095-16100.
- Shimada, T., Koumoto, Y., Li, L., Yamazaki, M., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2006). AtVPS29, a putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage proteins. *Plant Cell Physiol* *47*, 1187-1194.
- Shimada, T., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (1997). A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiol* *38*, 1414-1420.
- Shimada, T., Watanabe, E., Tamura, K., Hayashi, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2002). A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant Cell Physiol* *43*, 1086-1095.

BIBLIOGRAFÍA

- Song, J., Lee, M. H., Lee, G. J., Yoo, C. M., and Hwang, I. (2006). Arabidopsis EPSIN1 plays an important role in vacuolar trafficking of soluble cargo proteins in plant cells via interactions with clathrin, AP-1, VTI11, and VSR1. *Plant Cell* *18*, 2258-2274.
- Song, K., Jang, M., Kim, S. Y., Lee, G., Lee, G. J., Kim, D. H., Lee, Y., Cho, W., and Hwang, I. (2012). An A/ENTH domain-containing protein functions as an adaptor for clathrin-coated vesicles on the growing cell plate in Arabidopsis root cells. *Plant Physiol* *159*, 1013-1025.
- Stefano, G., Renna, L., Rossi, M., Azzarello, E., Pollastri, S., Brandizzi, F., Baluska, F., and Mancuso, S. (2010). AGD5 is a GTPase-activating protein at the trans-Golgi network. *Plant J* *64*, 790-799.
- Sudhof, T. C., and Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* *323*, 474-477.
- Surpin, M., Zheng, H., Morita, M. T., Saito, C., Avila, E., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Kovaleva, V., Carter, D., Murphy, A., *et al.* (2003). The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *Plant Cell* *15*, 2885-2899.
- Takagi, J., Renna, L., Takahashi, H., Koumoto, Y., Tamura, K., Stefano, G., Fukao, Y., Kondo, M., Nishimura, M., Shimada, T., *et al.* (2013). MAIGO5 functions in protein export from Golgi-associated endoplasmic reticulum exit sites in Arabidopsis. *Plant Cell* *25*, 4658-4675.
- Takahashi, H., Tamura, K., Takagi, J., Koumoto, Y., Hara-Nishimura, I., and Shimada, T. (2010). MAG4/Atp115 is a golgi-localized tethering factor that mediates efficient anterograde transport in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* *51*, 1777-1787.
- Tanabe, K., Torii, T., Natsume, W., Braesch-Andersen, S., Watanabe, T., and Satake, M. (2005). A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Mol Biol Cell* *16*, 1617-1628.
- Thole, J. M., and Nielsen, E. (2008). Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Curr Opin Plant Biol* *11*, 620-631.
- Tormakangas, K., Hadlington, J. L., Pimpl, P., Hillmer, S., Brandizzi, F., Teeri, T. H., and Denecke, J. (2001). A vacuolar sorting domain may also influence the way in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* *13*, 2021-2032.
- Toyooka, K., Okamoto, T., and Minamikawa, T. (2000). Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol* *148*, 453-464.
- Tse, Y. C., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, S. W., Robinson, D. G., and Jiang, L. (2004). Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* *16*, 672-693.
- Uemura, T., Kim, H., Saito, C., Ebine, K., Ueda, T., Schulze-Lefert, P., and Nakano, A. (2012). Qa-SNAREs localized to the trans-Golgi network regulate multiple transport pathways and extracellular disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 1784-1789.
- Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N., *et al.* (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics* *6*, 1226-1238.
- Vernoud, V., Horton, A. C., Yang, Z., and Nielsen, E. (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol* *131*, 1191-1208.
- Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., *et al.* (2005). Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* *7*, 1224-1231.
- Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y. D., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., *et al.* (2010). Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell* *22*, 1344-1357.

BIBLIOGRAFÍA

- Vitale, A., and Ceriotti, A. (2004). Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? *Plant Physiol* *136*, 3420-3426.
- Vitale, A., and Hinz, G. (2005). Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends Plant Sci* *10*, 316-323.
- Vitale, A., and Raikhel, N. V. (1999). What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends Plant Sci* *4*, 149-155.
- Wang, X., Cai, Y., Wang, H., Zeng, Y., Zhuang, X., Li, B., and Jiang, L. (2014). Trans-Golgi network-located AP1 gamma adaptins mediate dileucine motif-directed vacuolar targeting in Arabidopsis. *Plant Cell* *26*, 4102-4118.
- Wolfenstetter, S., Wirsching, P., Dotzauer, D., Schneider, S., and Sauer, N. (2012). Routes to the tonoplast: the sorting of tonoplast transporters in Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Cell* *24*, 215-232.
- Yamazaki, M., Shimada, T., Takahashi, H., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2008). Arabidopsis VPS35, a retromer component, is required for vacuolar protein sorting and involved in plant growth and leaf senescence. *Plant Cell Physiol* *49*, 142-156.
- Young, A. (2007). Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 448-458.
- Zheng, H., von Mollard, G. F., Kovaleva, V., Stevens, T. H., and Raikhel, N. V. (1999). The plant vesicle-associated SNARE AtVT11a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Mol Biol Cell* *10*, 2251-2264.
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M., and Helms, V. (2011). Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* *1808*, 912-924.
- Zouhar, J., Munoz, A., and Rojo, E. (2010). Functional specialization within the vacuolar sorting receptor family: VSR1, VSR3 and VSR4 sort vacuolar storage cargo in seeds and vegetative tissues. *Plant J* *64*, 577-588.
- Zouhar, J., and Rojo, E. (2009). Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Curr Opin Plant Biol* *12*, 677-684.
- Zouhar, J., Rojo, E., and Bassham, D. C. (2009). AtVPS45 is a positive regulator of the SYP41/SYP61/VT112 SNARE complex involved in trafficking of vacuolar cargo. *Plant Physiol* *149*, 1668-1678.
- Zwiewka, M., Feraru, E., Moller, B., Hwang, I., Feraru, M. I., Kleine-Vehn, J., Weijers, D., and Friml, J. (2011). The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in Arabidopsis. *Cell Res* *21*, 1711-1722.