

1-INTRODUCCIÓN	9
1.1 EFECTOS DE LA SAL (NaCl) EN PLANTAS.....	11
1.1.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN.....	14
1.1.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA A SAL.....	15
1.2 EFECTOS DE LA SEQUÍA EN PLANTAS.....	16
1.2.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN.....	18
1.2.1.1 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS PROTEIN-KINASAS.....	18
1.2.1.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN POR FOSFOLÍPIDOS.....	19
1.2.1.3 SEÑALIZACIÓN DEL ESTRÉS OSMÓTICO MEDIADA POR ABA.....	20
1.2.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA.....	21
1.2.2.1 METABOLISMO CAM.....	22
1.2.2.2 CAMBIOS METABÓLICOS.....	23
1.2.2.3 AJUSTE OSMÓTICO.....	23
1.2.2.4 AJUSTE ESTRUCTURAL.....	24
1.2.2.5 DEGRADACIÓN Y REPARACIÓN.....	24
1.2.2.6 ELIMINACIÓN DE TOXINAS.....	24
1.2.2.7 PROTEÍNAS ABUNDANTES EN ETAPAS TARDÍAS DE LA EMBRIOGÉNESIS (LEA).....	25
1.3 EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD Y SEQUÍA EN LA PRODUCCIÓN VEGETAL.....	25
1.3.1 EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD.....	26
1.3.2 EL PROBLEMA DE LA SEQUÍA.....	27
1.3.3 IMPORTANCIA DE LA MEJORA VEGETAL: USO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS.....	27
1.3.4 USO DE SISTEMAS MODELOS EN BIOLOGÍA.....	29
1.4 ANTECEDENTES Y TRABAJO PREVIO.....	30
1.4.1 ELECCIÓN DE RCY1.....	32
1.5 PROTEÍNAS TIPO SR O “SR LIKE”.....	33
1.5.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES.....	33
1.5.2 FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS TIPO SR.....	34
1.6 PROCESOS EN LOS QUE PODRÍA ESTAR IMPLICADA RCY1.....	35
1.6.1 TRANSCRIPCIÓN.....	35
1.6.2 PROCESAMIENTO DE INTRONES O SPLICING.....	39
1.6.2.1 ADICIÓN DE UNA CAPERUZA O CAPPING.....	40
1.6.2.2 PROCESAMIENTO DE INTRONES O SPLICING.....	41
1.6.2.3 POLIADENILACIÓN.....	48
1.6.3 TRANSPORTE NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO.....	49
1.6.4 TRADUCCIÓN.....	53
2-OBJETIVOS	55
3-MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
3.1 MATERIALES.....	58
3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	58
3.1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	58
3.1.1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
3.1.1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
3.1.2 VECTORES.....	59
3.1.3 OLIGONUCLEÓTIDOS.....	61
3.2 TÉCNICAS DE CULTIVO.....	64
3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	64
3.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
3.2.3.1 Cultivo “in Vitro” de células en suspensión.....	64
3.2.3.2 Germinación “in Vitro” de semillas.....	65
3.2.3.3 Cultivo en maceta:.....	65
3.3 TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN.....	66
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	66
3.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
3.3.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
3.3.3.1 Células en suspensión.....	67
3.3.3.2 Plantas adultas.....	67
3.4 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	68

3.4.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	68
3.4.1.1 Extracción de DNA.....	68
3.4.1.2 Extracción de RNA de plantas.....	70
3.4.2 GELES DE AGAROSA.....	70
3.4.2.1 Preparaciones para DNA.....	70
3.4.2.2 Preparaciones para RNA.....	71
3.4.3 AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA.....	72
3.4.4 AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR.....	72
3.4.5 CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	73
3.4.6 MARCAJE RADIACTIVO DE SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	73
3.4.6.1 Sondas de DNA.....	73
3.4.6.2 Sondas RNA.....	74
3.5 CLONACIÓN DE DNA.....	74
3.5.1 MÉTODO DE CLONACIÓN “GATEWAY”.....	74
3.5.2 CLONACIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	76
3.6 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	77
3.6.1 NORTHERN BLOT.....	77
3.6.2 RT-PCR.....	78
3.7 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	79
3.7.1 INMUNOLocalización.....	79
3.8 TRANSCRIPCIÓN “in Vitro”.....	80
3.8.1 AISLAMIENTO DE NÚCLEOS.....	80
3.8.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO NUCLEAR.....	81
3.8.3 TRANSCRIPCIÓN “in Vitro”.....	82
3.9 DETECCIÓN DE GUS.....	82
4-RESULTADOS.....	83
4.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE RCY1.....	85
4.1.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA.....	85
4.1.2 “BLAST” DE RCY1.....	87
4.1.3 ESTRUCTURA PRIMARIA.....	91
4.1.4 ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	92
4.1.5 ESTRUCTURA TERCIARIA.....	93
4.1.6 MODIFICACIONES POST-TRANSCRIPCIONALES DE LA PROTEÍNA.....	94
4.1.7 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.....	96
4.1.8 ANÁLISIS DEL PROMOTOR DE RCY1.....	96
4.1.9 NORTHERN DIGITAL DE RCY1.....	97
4.2 EXPRESIÓN DEL GEN RCY1.....	99
4.2.1 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>RCY1</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.....	99
4.2.1.1 TRATAMIENTO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SALES (NaCl y LiCl): PLANTAS EN MACETA Y LARGA DURACIÓN.....	99
4.2.1.2: TRATAMIENTO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SALES (NaCl y LiCl): CULTIVOS LÍQUIDOS Y CORTA DURACIÓN.....	101
4.2.1.3 CINÉTICAS DE LA ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN: PLANTAS EN MACETA Y LARGA DURACIÓN.....	103
4.2.1.4 CINÉTICAS DE LA ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN: CULTIVO LÍQUIDO Y CORTA DURACIÓN.....	104
4.2.2 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>RCY1</i> DURANTE TRATAMIENTOS DE ESTRÉS HÍDRICO.....	106
4.2.3 EXPRESIÓN DE <i>RCY1</i> DURANTE OTROS TRATAMIENTOS ESTRESANTES Y FITOQUÍMICOS.....	108
4.2.3.1 TRATAMIENTOS EN MACETA Y DE LARGA DURACIÓN.....	108
4.2.3.2 TRATAMIENTOS EN CULTIVO LÍQUIDO Y DE CORTA DURACIÓN.....	109
4.2.4 EXPRESIÓN TOPOGRÁFICA DE <i>RCY1</i>	111
4.3 ANÁLISIS DEL PROMOTOR DE <i>RCY1</i> MEDIANTE GENES TESTIGO.....	113
4.3.1 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DEL GEN <i>RCY1</i>	113
4.3.1.1 EXPRESIÓN DEL PROMOTOR EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.....	117
4.3.1.2 EXPRESIÓN DEL PROMOTOR EN CONDICIONES DE SEQUÍA.....	118

4.4 ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>RCY1</i> POR SOBREEXPRESIÓN EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
4.4.1 TOLERANCIA A NaCl	120
4.4.2 TOLERANCIA A SEQUÍA	124
4.4.3 TOLERANCIA A LiCl	127
4.4.4 TOLERANCIA A CALOR Y FRÍO	129
4.5 ANÁLISIS DE UN MUTANTE “ <i>knock out</i> ” DE <i>RCY1</i>	129
4.5.1 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES “K.O.”	131
4.5.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MUTANTES “K.O.”	133
4.6 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>RCY1</i>	135
4.6.1 COLOCALIZACIÓN DE <i>RCY1</i>	138
4.6.2 DINÁMICA DE <i>RCY1</i> EN RESPUESTA A SAL	139
4.6.3 LOCALIZACIÓN DE LOS DOMINIOS DE <i>RCY1</i> POR SEPARADO	143
4.7 LOCALIZACIÓN Y DINÁMICA DE OTRAS PROTEÍNAS NUCLEARES	144
4.7.1 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	144
4.7.2 DINÁMICA SUBCELULAR	145
4.7.3 MOVILIDAD DE LOS CUERPOS DE CAJAL EN PLANTAS SOBREEXPRESANDO <i>RCY1</i>	148
4.8 PROTECCIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN “ <i>In Vitro</i> ” FRENTE A NaCl, MEDIADA POR <i>RCY1</i>	150
5-DISCUSIÓN	153
5.1 EXPRESIÓN DE <i>RCY1</i>	155
5.1.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN	155
5.1.2 ANÁLISIS DEL PROMOTOR	157
5.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>RCY1</i> POR SOBREEXPRESIÓN Y CON MUTANTES EN <i>Arabidopsis thaliana</i>	158
5.2.1 SOBREEXPRESIÓN EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	158
5.2.2 MUTANTE K.O. PARA <i>RCY1</i>	159
5.3 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>RCY1</i>	160
5.4 POSIBLE MECANISMO DE FUNCIONAMIENTO DE <i>RCY1</i>	161
6-CONCLUSIONES	165
7-BIBLIOGRAFÍA	167

AGRADECIMIENTOS

Aunque durante estos últimos años, siempre fantaseaba con el momento en el que escribiría los agradecimientos de mi Tesis doctoral, hecho que indicaría que ha concluido este periodo, parece que la tarea es más complicada de lo que imaginaba. Y es que han sido tantos los que me han ayudado, y tengo tan poca memoria, que temo dejarme a alguien en el teclado (antes llamado tintero). Esto provoca en mí una ansiedad sólo comparable aquellas aciagas tardes en las que los experimentos decidían no manifestarse ante mí. Pero allí estaban mis compañeros y amigos de laboratorio (Vasile, Lucrecia, Susana, Laurita, Sandra, José Félix y Miguel Ángel (el científico antes conocido como chileno) y sobre todo mi director Óscar Vicente, para apoyarme, ayudarme, y en muchas ocasiones hacerme olvidar los malos resultados que obtenía de aquellos locos experimentos, en ocasiones rocambolescos e inverosímiles, pero siempre divertidos. Aunque en ocasiones estos complicados experimentos sí daban sus frutos, como ocurrió en el John Innes Institute donde gracias a la ayuda incondicional de todos sus miembros especialmente Ali Pendle, Mario Izaguirre, Peter McKeown y Olga Koroleva, y sobre todo del Dr. Peter Shaw, que me acogió como uno más, pude cumplir uno de mis proyectos más especiales, pero también pude disfrutar de su compañía y amistad, siempre que las inclemencias de la climatología inglesa lo permitieran, claro. Estos buenos resultados los pude celebrar a la vuelta con Diego, Pedrito, Santiago, Paco Vera y todos los demás compañeros del IBMCP, los cuáles no voy enumerar, porque les doy las gracias a todos y cada uno de ellos.

Bien merece un párrafo aparte el personaje que a continuación os describo, aunque para qué os lo voy a describir si seguro que ya lo conoce todo el mundo, y encima creo que es indescriptible. Como habréis adivinado me refiero al Flati (Pablo Antonio para los amigos), sin duda la persona que mejores consejos científicos me ha dado y con el que siempre podía decir: “*que buen ratico he pasao*”.

Me llena de orgullo y satisfacción poder decir que tengo como amigos a Javi, Christian y José Ángel, que aunque no estaban aquí físicamente, siempre me ayudaban en todo, eso sí, mezclando biología con diversión. El que sí estaba siempre era Kapa, una de las personas más generosas que conozco, que junto a Pablo, logró que me sintiera como en casa, y menuda casa....

Por supuesto no puedo olvidar al Ministerio de Educación y Ciencia por su financiación, y al IBMCP y a la UPV por sus infraestructuras y apoyo.

En el ámbito más personal no puedo olvidarme de PePe y Ricky, que siempre me saben provocar una sonrisa inspiradora.

También quiero hacer justicia nombrando en un lugar de honor a mi mejor y más fiel amigo, el Kito. Gracias amigo, nunca te olvidaré.

Pero durante estos años no he podido estar con toda la gente que quisiera, ya que Gabi, Tishy, Jose, y últimamente la pequeña Ariadna hacían más difícil la vuelta a Valencia después del fin de semana. A ellos les quiero agradecer el que sean como son conmigo.

Si antes decía que alguien merecía un párrafo, creo que ella lo merece todo. Maribel, espero que cuando leas esto estés junto a mí, porque ahí es donde quiero que estés para siempre.

Creo que este es el momento más emocionante para mí, porque es hora de recordar a las personas que me dieron la vida, dando después toda su vida por mí. Bartolo y Trini, papá y mamá, nunca podré agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí, sólo puedo decirlos que os quiero.

RESUMEN

La mayor parte de la pérdida de producción vegetal en el planeta es debida principalmente a la salinidad y a la sequía, junto con la aparición de temperaturas extremas (Epstein et al., 1980; Yancey et al., 1982). Este factor, entre otros, provoca que el estudio de los procesos de tolerancia a estos estreses sea de vital importancia, no sólo desde el punto de vista biológico, donde existen plantas capaces de tolerar concentraciones extremas de sales y periodos enormes de tiempo sin agua, sino que desde el punto de vista humano, el estudio de estos procesos beneficia sin duda el aspecto económico de la agricultura. Este beneficio humano obtenido, podría, siendo muy optimistas, resolver los problemas de hambruna de vastos territorios desertificados o salinizados, aunque siendo más realistas, podría permitir en un futuro no muy lejano utilizar agua de mar poco tratada para el riego de cultivos.

Siguiendo este planteamiento y utilizando datos previos del “screening” funcional de genes de *Arabidopsis thaliana* en levadura (Forment et al., 2002), se inició esta Tesis doctoral tomando al gen *RCY1* como protagonista.

Este gen implicado presuntamente en procesamiento de mRNA fue sometido a estudio, siguiendo el dogma de su relación con la tolerancia a estrés salino en levadura.

Así, se realizaron una serie de estudios en *Arabidopsis thaliana*, encaminados a comprobar si en esta planta, de donde procede el gen, también interviene en procesos de tolerancia a sal, así como encaminados a discernir parte del mecanismo de acción del gen con o sin sal.

En primer lugar se comprobó que la expresión de dicho gen en esta planta se dispara en situaciones de estrés salino (NaCl y LiCl), hídrico (ausencia de riego) y osmótico (sorbitol). Es decir, a partir de una expresión basal muy baja y sometiendo a la planta a dichos estreses, los niveles de mRNA de *RCY1* aumentan significativamente.

También se ha comprobado que de forma silvestre y en ausencia de sal, este gen no tiene una expresión importante en ningún órgano de la planta, a excepción de anteras, polen y estigma donde la presencia de mRNA de *RCY1* es abundante. Teniendo en cuenta que en estos órganos se produce un proceso natural de desecación, no es arriesgado pensar que *RCY1* podría estar implicado en la viabilidad de las células sometidas a este estrés osmótico.

Posteriormente se obtuvo plantas transgénicas sobreexpresando el gen. El resultado fue la tolerancia que mostraban dichas plantas transgénicas tanto a estrés salino, como hídrico. Este hecho se pudo comprobar gracias a las diferencias de pesos seco y fresco que presentaban las plantas transgénicas, con respecto a plantas silvestres, al ser sometidas a

tratamientos con NaCl, LiCl y ausencia de riego. En las plantas transgénicas siempre había unos mayores pesos seco y fresco acumulado después de los tratamientos.

Los datos obtenidos en plantas carentes de *RCY1* (mutantes “Knock out” cedidos por el Salk Institute) no mostraban que estas plantas fueran más sensibles a sal, pero sí nos mostraron que la ausencia de este gen en homocigosis impide que el polen se desarrolle de forma normal, apareciendo plantas sin polen. Este dato nos vuelve a llevar a la idea de la implicación de *RCY1* en el proceso de gametogénesis, por su presencia en polen, antera y estigma.

Se comprobó también que la proteína codificada por este gen y fusionada a la gfp (green fluorescent protein) se localizaba en el nucleolo y algunos cuerpos nucleares (datos obtenidos en la estancia realizada en el John Innes Institute, en el laboratorio del Dr. Peter Shaw). Sorprendentemente resultó que al tratar las células transformadas con dicha fusión proteica con NaCl, *RCY1* se deslocalizaba hasta ocupar la totalidad del nucleoplasma celular. Este proceso se comprobó con otras proteínas nucleares, pero en ningún caso a los niveles de *RCY1*, que con 10mM de NaCl ya comenzaba su movimiento. De estos datos obtenidos podemos inferir que *RCY1* es una proteína altamente sensible a sal y si tenemos también en cuenta los datos de su estructura, posiblemente esté relacionada con el procesamiento de mRNA, ya que siempre esta localizada en el nucleoplasma, pudiendo ser el nucleolo su lugar de almacenamiento.

Por último se ha comprobado que la presencia de *RCY1* confiere cierta protección a ensayos de transcripción “in Vitro” en los que se ha añadido una alta concentración de NaCl. Es decir, los extractos celulares de plantas transgénicas sobreexpresando *RCY1* resultan ser más tolerantes a la presencia de sal durante un ensayo de transcripción “in Vitro”. Esto nos ha mostrado el camino de cuál puede ser uno de los mecanismos de acción de *RCY1* durante el estrés salino e hídrico.

1-INTRODUCCIÓN

1.1 EFECTOS DE LA SAL (NaCl) EN PLANTAS

Aunque las plantas vasculares, al igual que todos los seres vivos conocidos, surgieran del medio marino, el catión Na^+ no se encuentra entre sus iones fisiológicos, es más, no existe ningún suelo, aparte del suelo costero, donde el NaCl sea un componente importante (Tan y Tan, 1998).

Solo desde que comenzó la domesticación del suelo de forma masiva en el Neolítico (Olsson, 2001), las plantas glicófitas (sensibles a sal) cultivadas, y en general todas las plantas cercanas a los cultivos, comenzaron a estar en contacto con ésta y otras sales, debido a la desecación de los acuíferos y al riego con aguas duras.

Normalmente se define la tolerancia a sal, como la diferencia de porcentaje de biomasa perdida durante un tratamiento salino y a largo plazo (Munns, 2002), con respecto a un tratamiento no salino, es decir, cuanta más biomasa pierda una especie al ser tratada con sal, menos tolerante es. Como ejemplo nos serviría comparar un tratamiento con 200mM de NaCl en remolacha, que reduciría un 20% el peso seco y es clasificada como tolerante a sal, en algodón, que reduciría un 60% su biomasa y se clasificaría como moderadamente tolerante, y en soja, que provocaría la muerte de la planta, clasificándose ésta como sensible a sal (Greenway and Munns, 1980). Continuando con esta clasificación, aparecen las plantas resistentes a sal o halófitas, que no sólo son capaces de tolerar elevadas concentraciones de ésta sin reducir ni un miligramo su biomasa con respecto al control, sino que en muchos casos la sal es un estimulante necesario del crecimiento (Flowers et al., 1986). Aplicando el ejemplo anterior, obtendríamos que la halófito *Suaeda maritima* (Fam. Crassulaceae) necesita de esos 200mM de NaCl para su correcto desarrollo (Flowers et al. 1977, 1986)

Como ya se ha indicado, el efecto de la sal en la planta depende de la concentración, como ocurre con todo tipo de sustancias, pero en este caso es importante indicar que a bajas concentraciones la sal causa un efecto tóxico en la célula por el efecto de sus iones por separado, pero cuando aumenta su concentración y por tanto aumenta aún más este efecto, es sumatorio el efecto osmótico de la sal, es decir el efecto general que provoca desecación o plasmolisis celular. Así, a concentraciones elevadas de NaCl, ambos efectos convivirán en el estrés y serán indistinguibles. Por esto, muchas veces se utiliza LiCl como sal estresante, ya que en ocasiones, una concentración baja de NaCl no es suficiente para causar un efecto fenotípico visible provocado por el componente tóxico, contrastando con la mayor potencia tóxica del LiCl. También es común usar una solución concentrada de macronutrientes

[Medio Hoagland (Hoagland and Snyder 1933) modificado] para poder distinguir sendos efectos (Termaat and Munns, 1986).

Fisiológicamente hablando, uno de los efectos que más temprano se puede detectar al tratar con NaCl es la reducción en la tasa de crecimiento de las hojas, como se ha comprobado en maíz (Cramer and Bowman, 1991; Neumann 1993), arroz (Yeo et al., 1991) y trigo y cebada (Passioura and Munns, 2000). Pero estos efectos también se pueden detectar al tratar con KCl o manitol, sustancias que sólo provocan estrés osmótico (Yeo et al., 1991; Chazen et al., 1995). Por esto, no se puede decir que este efecto esté exclusivamente causado por la sal.

Ocurre algo similar en raíz. No tan súbito, pero sí rápido es el descenso de la tasa de elongación al tratar con dicha sal (Rodríguez et al., 1997). También obtenemos este efecto al tratar sólo con KCl o manitol (Frensch and Hsiao, 1994; 1995), por lo que tampoco se puede decir que este es un efecto específicamente salino.

Sí obtenemos este efecto específico en el caso de la deficiencia de calcio en las raíces. Al añadir sal al medio de crecimiento, desciende la actividad de este catión (Cramer and Läuchli, 1986), descendiendo como se ha indicado anteriormente la tasa de crecimiento. Este efecto no ocurre con tratamientos exclusivamente osmóticos, y puede ser paliado con la adición exógena de calcio (Cramer et al., 1988).

Fenotípicamente hablando, los efectos de la sal comienzan a observarse a más largo plazo. Un primer síntoma puede estar en el amarilleamiento de las hojas jóvenes y la muerte de las hojas más viejas, siendo ésta el lugar donde se está acumulando el exceso de sal.

Pero todos estos efectos a nivel fisiológico y fenotípico, tienen su origen a nivel molecular. Numerosos son los procesos descritos en los que intervienen los iones de la sal, destacando entre otros el desplazamiento de cationes fisiológicos de los centros activos de algunas enzimas, por la acción de Na^+ y Li^+ . Así se ha demostrado que la actividad de enzimas como la malato deshidrogenasa, aspartato transaminasa, glucosa-6 deshidrogenasa o isocitrato liasa provenientes de guisante (*Pea sativa*), son inhibidas por la adición “in Vitro” de NaCl (Greenway and Osmond, 1972). También es conocido que una enzima tan crucial como la RUBISCO, es inhibida por NaCl en garbanzo (*Cicer arietinum*) (Soussi et al., 1998).

Mención especial requieren también los homólogos en planta de los genes HAL de levadura. Estos genes fueron identificados en levadura como dianas de la toxicidad iónica, ya que en general su sobreexpresión en *Saccharomyces cerevisiae* aumenta la tasa de tolerancia. Destaca el gen descrito en levadura HAL2 (Gläser et al., 1993; Murgía et al., 1995; 1996), del cual se han encontrado homólogos en *Arabidopsis thaliana* como SAL1 (Quintero et al., 1996) o AHL (Gil-Mascarell et al 1999). Concretamente este gen codifica una nucleotidasa

que desfosforila el 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), y que se inhibe en presencia de NaCl y LiCl, pero no en el caso de KCl. Así, como este gen interviene en la ruta de asimilación del azufre, podemos decir que estas sales influyen negativamente en esta ruta al inhibir una de sus enzimas.

También se han encontrado homólogos al gen descrito en *Saccharomyces cerevisiae* HAL3 (De Nadal et al., 1998) en *Arabidopsis thaliana* (Espinosa-Ruiz et al., 1999), siendo esta proteína una subunidad inhibidora de la fosfatasa de nucleótidos Ppz1, que se inhibe en presencia de NaCl y LiCl.

También es importante la inhibición del proceso fotosintético, por la acción del cloruro sódico en distintas especies vegetales (Downtown, 1977; Bethke and Drew, 1992; Longstreth and Nobel, 1979). Aunque el daño principal de los fotosistemas por la sal no es directo, sino que es consecuencia de procesos secundarios causados por la sal, como el aumento del estrés oxidativo en cloroplastos (Hernández et al., 1995) o el descenso general de nutrientes necesarios para el buen funcionamiento de este proceso que provoca el estrés salino, debido a la dificultad que experimenta la planta para tomarlos desde el suelo en presencia de NaCl (Couia et al., 1994; Martinez and Lauchli, 1994; Fernández-García et al., 2002). Sí encontramos un proceso de daño directo de los fotosistemas al desplazar el ion Na^+ al Ca^{++} (Shen and Kato, 1991) siendo este efecto totalmente reversible.

Otro factor limitante del crecimiento, provocado por la sal, es la estabilización del DNA en general (Chadalavada et al., 1997). Es decir, el NaCl provoca un aumento de la T_m del DNA, dificultando que enzimas como la RNA polimerasa puedan unirse a él. Al mismo tiempo las DNAsas y nucleasas hacen su trabajo degradando esta molécula y provocando, muerte celular, al menos observada en meristemo radicular de cebada (Katsuhara and Kawasaki, 1996). Aunque este proceso sea provocado por el componente tóxico de la sal, se ha detectado que algunos osmolitos como la prolina o betaina, aparte de proteger ante un estrés osmótico, pueden hacer descender la T_m y por tanto contrarrestar el efecto de la sal (Chadalavada et al., 1997).

Recientemente, están apareciendo estudios que relacionan procesos generales de la maquinaria celular, con el estrés salino. Es decir, existen procesos celulares (transcripción, traducción, replicación de DNA, etc...), que son más sensibles que otros procesos en condiciones salinas (Serrano, 1996; Dichtl et al, 1997), empezando a no funcionar correctamente a menor concentración salina, y actuando por tanto de factores limitantes del crecimiento. Así, sin conocerse exactamente a que nivel actúa la sal, se sabe que esta inhibe estos procesos y se tendrá que buscar cual es la diana exacta de toxicidad.

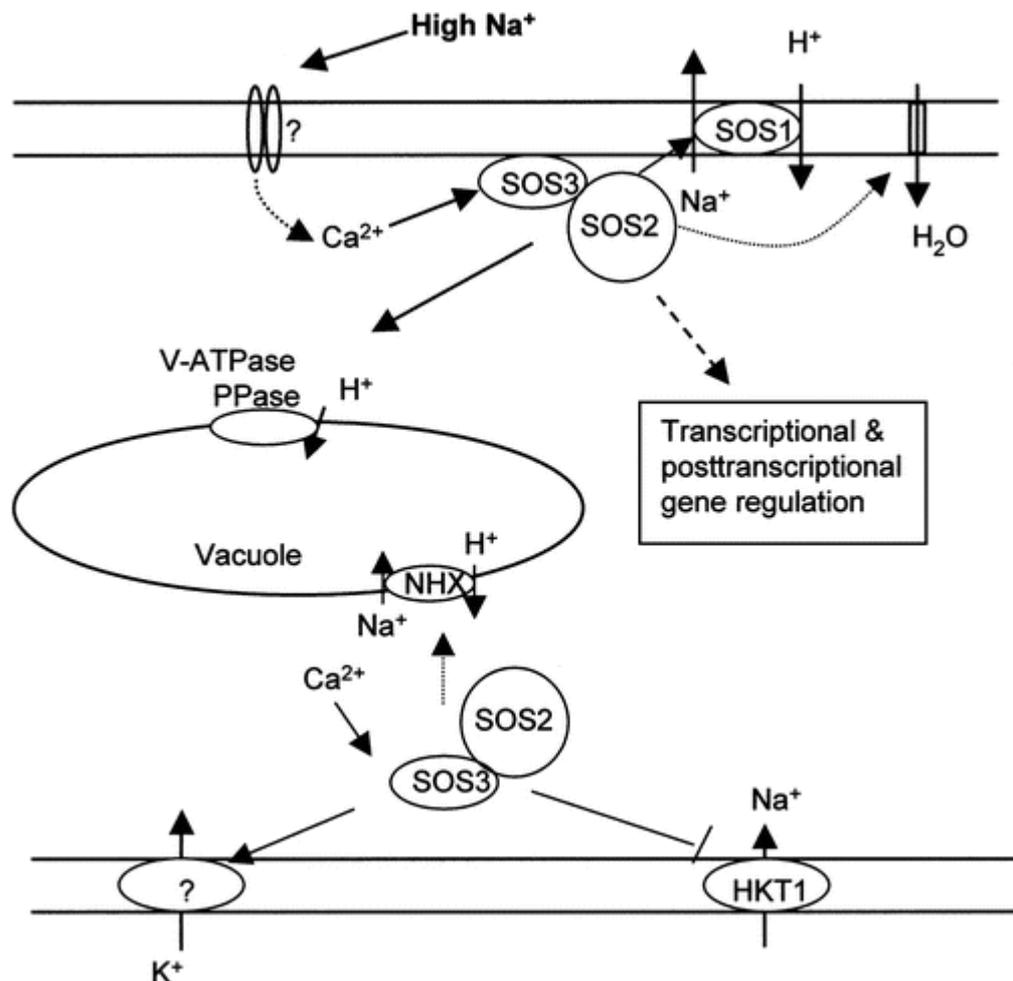
Todos estos efectos provocan que el NaCl (y otras sales de comprobada toxicidad) cause en las plantas no resistentes, una serie de daños que limitan el crecimiento e incluso en muchas ocasiones acaban en el óbito de la planta.

1.1.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN

Antes de exponer cómo las plantas son capaces de tolerar unas sustancias con tan numerosos efectos nocivos, es necesario explicar qué procesos median en la señalización de este estrés.

En estos mecanismos también hay una separación entre los dos componentes estresantes de la sal. Así, el factor el factor tóxico de la sal viene señalizado principalmente por la ruta SOS, una ruta de señalización y respuesta a NaCl que ha sido resultado de un análisis genético molecular y bioquímico (Zhu 2000).

Fig. 1: Mecanismos de señalización en respuesta a estrés salino. Esquema de la ruta de señalización y respuesta a NaCl SOS. Figura proveniente de la referencia (Zhu, 2002).



Ésta es una ruta de señalización exclusiva para el catión Na^+ . Ésta comienza cuando la elevada concentración de este ion es detectada por un receptor de membrana aún no descrito. Rápidamente se produce una movilización del calcio citosólico (Knight et al., 1997). El porqué esta señal de calcio es diferente a la disparada por frío, sequía u otros estímulos, es aún un misterio. Después este calcio se une a la proteína SOS3, que también requiere de una miristioloización para su activación (Ishitani et al., 2000; Liu and Zhu 1998). Esta SOS3 activa es capaz de unirse a SOS2 (Halfter et al., 2000; Liu et al 2000), una serin/treonin quinasa, regulando la unión entre ambas el nivel de expresión del antiportador de membrana Na^+/H^+ SOS1 (Shi et al., 2000). Posteriormente este sistema activará otras respuestas capaces de otorgar tolerancia a sal, que serán revisados en el apartado siguiente.

1.1.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA A SAL

Numerosos son los mecanismos que se han desarrollado durante la evolución vegetal, que permiten a las plantas tolerar e incluso resistir elevadas cantidades de sales. Los graves efectos provocados por la sal y desarrollados en apartados anteriores, han sido un importante factor de selección vegetal, es decir, los individuos que poseían algún factor que les otorgaba ventaja en suelos con sales no fisiológicas, lograban sobrevivir mejor, cediendo esas mutaciones a sus descendientes. También se cree que aunque, como ya se ha desarrollado, las plantas provengan del medio marino, muchos de sus elementos de tolerancia a sal no provengan de estos predecesores primitivos, sino que se han creado nuevos a base de la presión de selección ejercida por el estrés salino.

Así, podemos encontrar cambios bastante radicales en el metabolismo e incluso en la anatomía de las plantas, con respecto a su nivel de tolerancia.

En un primer nivel, se incluyen los cambios existentes para evitar la presencia de sales en el interior de la planta. En este aspecto destacan las glándulas de exclusión de sales (Ramadan, 1998; Ungar, 1987; Drennan et al, 1987), que son estructuras que aparecen en plantas, sobre todo halófitas, que se encargan de expulsar las sales provenientes de ambas vías vasculares, apoplasto y simplasto. Las sales quedan excluidas así del interior de la planta, quedando cristalizadas en el exterior de las hojas y no provocando ningún efecto nocivo. Destacan los géneros *Salicornia* y *Tamarix*.

En este nivel también aparecen estructuras destinadas a impedir la entrada de sales a nivel radicular. Así, encontramos bombas de exclusión salina en la vía simplasto (Schubert

and Lauchli, 1990; Wilson and Shannon, 1995) y aparición de succulencia (Naidoo and Rughunanan, 1990) que provoca que el potencial osmótico creado en el interior de la planta impida entrar por difusión cualquier sustancia por la vía apoplasto, siendo la única vía de entrada la simplástica, en la que es posible ejercer un mayor control de flujo.

En un segundo nivel aparece la acumulación de sales en estructuras internas de la planta, que provoca un doble efecto, evitar que la sal se localice libremente en todas las células, pudiendo afectar a cualquier proceso, y que el potencial osmótico sea menos negativo y la entrada de sales se ralentice. En este apartado podemos encontrar la acumulación de sal en estructuras muertas de la planta, como hojas (Munss and James, 2003), o en estructuras vivas, como vacuolas intracelulares (Harvey et al, 1976).

Un tercer nivel, compartido con la tolerancia a sequía, es el de acumulación de solutos compatibles, es decir, solutos no tóxicos para la planta, que elevan el potencial osmótico celular e impiden la entrada de sales al citoplasma, quedando la sal en el espacio extracelular. Destacan los casos del sorbitol (Ahmad et al, 1979), la prolina (Stewart and Lee, 1974) o la glicina-betaina (Hanson et al., 1994).

Otro nivel que encontramos es el nivel de mantenimiento de la homeostasis celular (Niu et al 1995). Es decir, es vital para la célula poder mantener este nivel evitando la entrada de sales por métodos distintos a los ya nombrados. Esto se consigue principalmente con antiportadores de membrana como SOS 1 (Shi et al, 2000) y NHX (Yokoi et al 2002) que expulsan Na^+ e introducen H^+ en *Arabidopsis thaliana*, manteniendo así la homeostasis celular y evitando la entrada del dañino ion Na^+ .

El último nivel de esta lista es el del proceso que llevan acabo algunas plantas, de aumentar la expresión de ciertas proteínas, que son una diana directa de la toxicidad, en condiciones de estrés salino. En este aspecto juegan un papel fundamental los promotores, que en algunos casos responden al estímulo estresante salino, provocando que los genes bajo su control se expresen más (Kreps et al., 2002). Este es un proceso general que también afecta a otros niveles en la tolerancia, como es el caso de la inhibición de enzimas por sal, pero que tiene especial importancia en este nivel, ya que puede que la simple presencia de mayores niveles de proteínas, confiera tolerancia.

1.2 EFECTOS DE LA SEQUÍA EN PLANTAS

En este caso, las plantas a lo largo de la evolución también tuvieron que hacer frente a una serie de cambios que les permitieran vivir fuera del medio marino. Sin embargo, las

plantas necesitan hidratarse constantemente, para mantener la turgencia celular fisiológica y además el agua absorbida sirve de vehículo para la toma de los nutrientes necesarios.

Pero existen en este planeta zonas donde la disponibilidad de agua es mínima, de forma temporal como por ejemplo la cuenca mediterránea donde existen épocas de sequía reseñable, que han provocado que la vegetación de esta zona sea especial y esté adaptada a temporadas de estrés hídrico entre otros factores (Suc, 1984). También existen zonas de sequía permanente, como cualquier zona desértica, en la que los efectos nocivos de la sequía son aún peores y la vegetación está totalmente especializada en resistir el estrés hídrico (Andersson et al., 1997).

También encontramos el efecto del hombre en lo que respecta al estrés hídrico, no sólo directamente y a consecuencia de la sobreexplotación de acuíferos y de la sobreexplotación de cultivos, sino también a consecuencia del cambio climático global, que está provocando una mayor desertificación de la superficie terrestre (Huntley, 1991; Walther et al., 2002).

Por tanto, estas alteraciones, tanto individuales como colectivas de plantas en zonas de estrés hídrico, tienen su origen en la presión selectiva causada por los efectos nocivos de la sequía.

Un primer efecto general podría ser el de la dificultad de toma de nutrientes, ya que si no hay agua en el suelo, el potencial hídrico de éste descenderá tanto que el balance estará decantado hacia el movimiento de agua desde la planta hasta el suelo (Stedle, 2000). En este caso la planta no podrá tomar los nutrientes por la vía pasiva apoplástica, sino que se verá obligada a usar la simplástica con el consiguiente gasto energético que esto conlleva.

Como efecto general también destaca la pérdida de turgencia celular, lo que imposibilitará la comunicación celular (Giles et al., 1976), llegando a ser letal para la planta.

Otro cambio general es el descenso en la respiración celular (Flowers and Hanson, 1969), debido al arrugamiento de las membranas de las mitocondrias (Miller et al., 1971). Este arrugamiento impide la comunicación entre las enzimas de la membrana mitocondrial, dificultando la respiración celular y la posterior formación de ATP.

También se puede detectar un descenso en la asimilación de CO₂ debido al cierre general de estomas para evitar la desecación (Chaves, 1991)

Más a nivel molecular, son muy pocos los efectos negativos conocidos, provocados por el estrés hídrico. Es más, en algunos sistemas se sabe que este estrés no provoca ningún efecto negativo, como es el caso del funcionamiento de los fotosistemas (Lu and Zhang, 1999; Genty et al., 1987; Nogués and Baker, 2000).

Por último hay que tener en cuenta que la sequía provoca indirectamente otro tipo de daños, sobre todo debido al aumento en el estrés oxidativo que sufren las plantas con estrés hídrico (Morán et al., 1994; Bartoli et al., 1999).

1.2.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN

Las plantas han desarrollado una serie de mecanismos que son capaces de detectar el estrés hídrico, antes de que ocurra un daño irreversible. Gracias a estos sistemas, en las plantas se pondrán en marcha una serie de mecanismos que provocarán cierto grado de tolerancia según las distintas especies.

Las respuestas que se van a exponer a continuación son respuestas a estrés osmótico, es decir siempre responden ante el estrés hídrico, pero responden también al componente osmótico de la sal, si es que la concentración de ésta es elevada, o a incluso, concentraciones elevadas de solutos compatibles en el medio de crecimiento de la planta.

1.2.1.1 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS PROTEIN-KINASAS

La fosforilación/desfosforilación es conocida como un proceso de señalización celular desde hace muchos años, funcionando también como señal del estrés osmótico.

Mientras que en levadura el proceso de señalización hiperosmótico es bien conocido (Gustin et al., 1998), en plantas mucho falta por conocer. La ruta osmorreguladora en levaduras empieza con la activación de los dominios SH3, que contienen algunas proteínas de membrana, o de las histidina kinasas de dos componentes. Ambas rutas activan una cascada de MAP kinasas, que finalmente provoca un aumento en la concentración de solutos compatibles.

En plantas son varias las MAP kinasas que se vuelven activas en presencia de estrés osmótico, aunque los mecanismos concretos no están bien establecidos.

Por ejemplo, en alfalfa la MAP kinasa denominada SIMK se vuelve activa en presencia de estrés hiperosmótico moderado, pero en presencia de estrés severo (mayor de 750mM de NaCl), es otra la MAP kinasa que se activa (Munnik et al., 1999). En tabaco se ha detectado este mismo efecto con la MAP kinasa SIPK (Mikolajczyk et al., 2000), que tiene

su homóloga en Arabidopsis ATMPK6 (Hoyos and Zhang, 2000) y también se activa durante el estrés hiperosmótico.

También se han identificado las siguientes enzimas en la ruta, las MAP kinasa kinasa, que son la SIMKK en alfalfa (Kiegerl et al., 2000) y la SIPKK en tabaco (Liu et al., 2000).

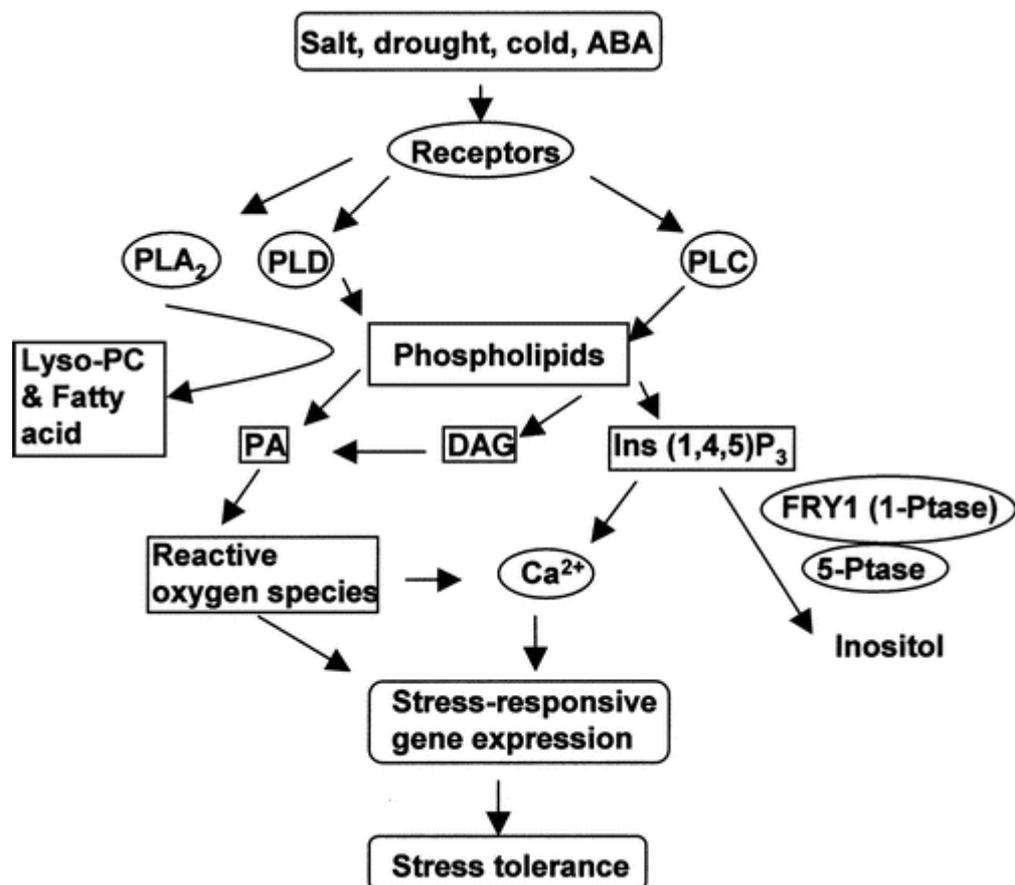
Otras rutas de MAP kinasas independientes a esta se han detectado en tabaco al activarse por estrés hiperosmótico, concretamente la ASK1 (Mikolajczyk et al., 2000), aunque su funcionamiento es aún un misterio.

Finalmente, hay que destacar que como en muchos otros tipos de estrés, el calcio actúa como mensajero en el estrés osmótico (Knight et al., 1997), por tanto las cascadas de CDPKs (Protein-kinasas dependientes de calcio) tienen un papel importante en la señalización, aunque la distinción que hacen en los distintos estreses es aún desconocida.

1.2.1.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN POR FOSFOLÍPIDOS.

Los fosfolípidos de membrana constituyen un sistema dinámico que genera multitud de señales en respuesta a estrés.

Fig. 2: Mecanismos de señalización por fosfolípidos. Elementos pertenecientes a la ruta de señalización de estrés por sal, sequía, frío o ABA, en la que intervienen los fosfolípidos. Figura proveniente de la referencia (Zhu, 2002).



Como se puede observar en la figura 2, los receptores activados frente a señales estresantes de frío, sal, sequía o a la hormona ABA, activan una serie de fosfolipasas, que a su vez generan una serie de segundos mensajeros, a partir de fosfolípidos. Posteriormente estos segundos mensajeros activarán una serie de mecanismos que provocará reacción en la planta frente a estos estreses.

Como ejemplo de este sistema nos serviría la acción de la fosfolipasa C (PLC), que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, generando los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). El IP₃ moviliza las reservas de Ca²⁺ intracelulares, mientras que el DAG activa a Protein-kinasa C. Varios estudios han demostrado la relación entre el estrés hiperosmótico y al aumento de IP₃ intracelular (DeWald et al., 2001; Drobak and Watkins, 2000; Heilman et al., 1999; Takahashi et al., 2001). El efecto del Ca²⁺ y las Protein-kinasa C se han desarrollado en el apartado anterior.

También es conocido como los niveles del precursor del IP₃, el PIP₂, se elevan en condiciones de estrés osmótico y ABA, gracias al aumento de la expresión génica de la enzima que genera este precursor, la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-kinasa (PIP5K), a partir de fosfatidilinositol 4-fosfato (Mikami et al., 1998). También se ha detectado el aumento de la expresión del gen que codifica a la PLC en Arabidopsis, después de someter a las plantas a estrés salino o hídrico (Hirayama et al., 1995). Por tanto está bien demostrado que un aumento de la actividad enzimática, y de la expresión génica van ligados en este tipo de señalización.

1.2.1.3 SEÑALIZACIÓN DEL ESTRÉS OSMÓTICO MEDIADA POR ABA

A parte de las conocidas funciones que posee esta hormona en el desarrollo y crecimiento de la planta, el ABA interviene de forma importante en la regulación del balance hídrico y en la señalización del estrés hídrico. Esto se demuestra observando el crecimiento de los mutantes carentes de ABA en presencia de estrés salino o hídrico. Estos mutantes crecen deficientemente con respecto a los silvestres durante estrés osmótico moderado. Si el estrés se agrava las plantas mutantes llegan a morir (Xiong et al. 2001).

Las principales funciones del ABA en la célula serán equilibrar el balance hídrico en la planta, actuando sobre las células de acompañamiento de los estomas, y tolerar la deshidratación celular, gracias a la inducción de genes de tolerancia.

Todo esto se produce gracias al aumento del ABA intracelular. Este proceso es bien conocido y se sabe que proviene del aumento en la síntesis y de la inhibición de la

degradación. Concretamente se sabe que la enzima que actúa como factor limitante de la síntesis es la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Koornneef et al., 1998) y su expresión es inducida por estrés osmótico (Iuchi et al., 2001; Qin and Zeevaart, 1999; Thompson et al., 2000). También son inducidas otras enzimas de la biosíntesis, pero parece que la mayor regulación está en la NCED.

Poco se conoce aún de la degradación y de cuáles son los procesos que median en la inducción de los genes de biosíntesis, aunque parece que el calcio esté relacionado.

Todo este aumento intracelular de fitohormona provoca principalmente un aumento en la expresión de algunos genes, al igual que ocurre con sal y sequía (Bray, 1993; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Zhu et al 1996). Estos genes activados por ABA y estrés, son principalmente de síntesis de osmolitos compatibles, de detoxificación celular, de prevención del daño o de reparación de la maquinaria celular (Zhu, 2001).

Concretamente, se ha estudiado a nivel del promotor, cuáles son los genes que se inducen por ABA, obteniéndose por ejemplo los motivos DRE, ABRE o MYCRS entre otros, como secuencias de nucleótidos en cis, necesarias para que la hormona o los estreses puedan inducir.

Como la señal citoplasmática del ABA u otros estreses llega a inducir genes en el núcleo, no está aún claro.

Pero la dificultad aumenta aún más al intentar conocer qué genes son específicos de uno u otro estrés y si el ABA interviene. Muchos son los genes activados por más de un estrés, como por ejemplo el RD29A (Liu et al., 1998; Nakashima et al., 2000) que es activado por estrés hídrico y salino, pero no es necesario que aparezca el ABA para su total inducción. A la vista de estos resultados, se puede decir que la respuesta a estrés osmótico, podrá ser mediada por dos vías generales de transducción de señales, una ABA-dependiente y otra ABA-independiente.

1.2.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA

Para poder soportar esta serie de efectos negativos, las plantas han desarrollado durante la evolución una serie de mecanismos que evitan el estrés.

1.2.2.1 METABOLISMO CAM

Sin duda, este tipo de metabolismo es el más destacado en respuesta a estrés hídrico, por su enorme efectividad.

En condiciones de estrés hídrico, los estomas de la planta deberán permanecer cerrados para evitar la pérdida de agua, por lo que un problema de estas plantas es la imposibilidad de realizar el intercambio gaseoso, al menos durante las horas de mayor iluminación, que son en las que más agua se evaporaría por los estomas, y son las horas a las que normalmente los estomas se abren. Así, sin la apertura estomática diurna, la RUBISCO no tendría suficiente cantidad de CO₂ y se primaría su actividad oxigenasa, dificultándose la fijación y el crecimiento celular.

Pero esto no ocurre en las plantas CAM. Estas plantas pertenecientes entre otras a las familias Crassulaceae, Cactaceae, Euphorbiaceae o Aizoaceae, son plantas suculentas que han desarrollado un sistema fisiológico general para evitar estos problemas durante el estrés hídrico. Así, estas plantas abren los estomas por la noche y realizan el intercambio gaseoso. Después para poder aprovechar el CO₂ que ha entrado durante la noche, las células del mesófilo unen la molécula del gas al ácido fosfoenolpirúvico (PEP), gracias a la PEP carboxilasa, formándose una molécula de ácido oxalacético, que después se transformará en ácido málico.

Durante el día, el ácido málico que se había formado se descarboxila en las células de la vaina, quedando libre una molécula de dióxido de carbono, que será usada en el ciclo de Calvin para formar glucosa. Con todo esto se evita que los estomas se abran durante las horas de más estrés hídrico y se prima que la actividad de la RUBISCO sea carboxilasa aunque no esté entrando el dióxido de carbono.

Aunque no se consiga tanta energía por CO₂ fijado, ya que en el almacenamiento de éste se pierde, éstas plantas tienen una mayor eficiencia de vida (fitness) en terrenos sometidos a un estrés hídrico. No podrán competir con otras plantas en terrenos con más precipitaciones (Hartsock and Nobel, 1976).

Una de las consecuencias de este metabolismo, es la aparición de suculencia, ya que el agua entra por la vía simplasto de forma activa, y es muy poca la que se pierde por la evapotranspiración, ya que los estomas de día están cerrados, acumulándose por ejemplo en hojas (Fam. Euphorbiaceae), tallos (Fam. Cactaceae) o ambos (Fam. Crassulaceae).

Esta succulencia, además permitirá a la planta no sufrir estrés hídrico en su interior, y que todos sus mecanismos funcionen con normalidad.

1.2.2.2 CAMBIOS METABÓLICOS

Uno de los primeros cambios que se detectan en la planta, durante el estrés hídrico, es a este nivel. En primer lugar se puede observar un súbito aumento de la actividad de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa debido a una inducción de la expresión (Velasco et al., 1994), debido principalmente al aumento en la demanda energética.

También se observa un aumento en la actividad de las proteasas, que despolimerizan proteínas redundantes y polipéptidos de reserva, para así poder hacer frente a la nueva formación masiva de proteínas de respuesta a estrés (Guerrero et al., 1990).

Pero uno de los principales cambios durante el estrés hídrico en el metabolismo es el incremento, tanto en la actividad como en la presencia de enzimas del metabolismo de los azúcares, sobretodo enzimas encargadas de sintetizar osmolitos compatibles que equilibren el estrés osmótico, como la $\delta\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetasa que está implicada en la biosíntesis de prolina (Yoshiba et al., 1995) o la betaina aldehído sintetasa, implicada en la síntesis de la glicina-betaina (Ishtani et al., 1995).

1.2.2.3 AJUSTE OSMÓTICO

En este aspecto se pueden destacar principalmente dos tipos distintos de reacciones que posee la planta para realizar un ajuste osmótico, la acumulación de osmolitos compatibles, y la creación de canales de exclusión iónica y de acuaporinas.

En cuanto a la primera reacción hay que destacar que la planta puede crear los osmolitos de novo, como ya se ha explicado en el apartado anterior, gracias al aumento en la actividad de enzimas de síntesis, o moverlos a partir de vacuolas de reserva.

En cuanto al segundo tipo de reacción existen numerosos ejemplos. Así existen clonados cDNA de canales de intercambio iónico, inducibles por estrés osmótico, como el 7a de *Pisum sativum* (Guerrero et al, 1990). También hay referencias de canales de intercambio acuoso como el RD28 de *Arabidopsis thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992) y el H2-5 de *Crociortegum plantagineum* (Daniels et al., 1994) que se activan en situaciones de estrés hídrico.

1.2.2.4 AJUSTE ESTRUCTURAL

Durante el estrés hídrico se producen alteraciones en la composición físico-química de la pared celular, implicándose en este efecto, cambios en la actividad de la S-adenosilmetionina sintasa (Espartero et al. 1994). Bajo condiciones no estresantes la sobreexpresión de dicha enzima provoca lignificación de tejidos (Peleman et al., 1989), notándose este efecto de lignificación durante estrés hídrico prolongado (Nonami and Boyer, 1990). Por tanto, la extensibilidad de la pared celular disminuye durante el estrés osmótico, así se favorece el mantenimiento de la turgencia celular evitándose la plasmólisis.

1.2.2.5 DEGRADACIÓN Y REPARACIÓN

Muchos son los genes que codifican proteasas que se inducen por sequía en *Pisum sativum* (Guerrero et al., 1990) y en *Arabidopsis thaliana* (Kiyosue et al., 1993; Koizumi et al., 1993; Williams et al., 1994). La misión de estas enzimas es la de degradar enzimas completamente inutilizables por el daño producido por el estrés hídrico, así como degradar proteínas de reserva para obtener aminoácidos para la masiva síntesis de proteínas de respuesta a estrés.

También existe un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la ubiquitinación durante la sequía (Kiyosue et al., 1994). Estas ubiquitinas serán las encargadas de señalar procesos de proteólisis en determinadas proteínas.

En lo que respecta a la reparación, hay que indicar que son numerosos los daños que se producen durante el estrés hídrico, como isomerización, desaminación oxidación, etc... de algunos residuos. Así podemos destacar el aumento de la actividad de proteínas como la L-isoaspartil metiltransferasa en situaciones de estrés osmótico (Mudgett and Clarke, 1994), que repara los residuos dañados L-aspartil, en L-aspartil.

También se ha observado que aparecen otras enzimas de expresión inducible por sequía, similares a las chaperoninas (Kiyosue et al., 1994), que provocan el correcto plegamiento de proteínas cuya estructura había sido dañada por el estrés.

1.2.2.6 ELIMINACIÓN DE TOXINAS

Uno de los estreses colaterales que se producen durante el estrés hídrico es el aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), que tantos daños provocan en la célula

vegetal. Esto, principalmente se debe a una combinación entre el aumento de la fotorrespiración para conseguir más energía y el cierre estomático, que impide el intercambio gaseoso normal. Así, se ha detectado el aumento de la actividad de enzimas de detoxificación de las ROS como la superóxido dismutasa o la glutatión reductasa, en respuesta a desecación celular (Mittler and Zilinskas, 1994).

1.2.2.7 PROTEÍNAS ABUNDANTES EN ETAPAS TARDÍAS DE LA EMBRIOGÉNESIS (LEA)

Estas proteínas provienen de genes cuya expresión se incrementa durante los procesos de desecación de la semilla. También se ha detectado que estos genes se inducen por estrés hídrico y por ABA. Aunque no se conoce perfectamente la actividad de estas proteínas, se cree que su actividad viene mediada por su alto contenido en aminoácidos hidrofílicos, lo que provocaría que se favoreciera la entrada y permanencia de agua en el interior celular, aunque el exterior esté totalmente seco. Actualmente también se cree que en los espacios entre nucleótidos de estas proteínas, pueden alojarse ciertos iones, por lo que se minimizaría el efecto tóxico también.

1.3 EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD Y SEQUÍA EN LA PRODUCCIÓN VEGETAL

La mayor parte de la pérdida de producción vegetal en el planeta es debida principalmente a la salinidad y a la sequía, junto con la aparición de temperaturas extremas (Epstein et al., 1980; Yancey et al., 1982). Debido a este aspecto, y a la mayor demanda de alimentos por el exponencial crecimiento poblacional al que está sometido el planeta, es necesario encontrar soluciones para la resolución del problema, no sólo a nivel político, con decisiones encaminadas a controlar la demografía o a controlar el uso de las tierras de cultivo, sino también a nivel biotecnológico, donde los investigadores debemos descubrir cuáles son los efectos de estos estreses, así como los mecanismos que provocan tolerancia, para después poder mejorar los vegetales interesantes desde el punto de vista agronómico.

1.3.1 EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD

Desde el punto de vista agronómico, la acumulación excesiva de sales en la rizosfera, se denomina salinidad (Gorham, 1992). Esta salinidad puede tener dos formas principales, la primaria o natural, que es la proveniente de los aerosoles marinos que son transportados por los vientos tierra adentro, la inundación periódica de tierras por agua del mar, y también por un proceso natural de acumulación de sales en el suelo si las precipitaciones son muy bajas. Por el contrario, la salinidad secundaria o antrópica, vendría definida como su propio nombre indica por la acción del hombre, y vendría provocada por la sobreexplotación de acuíferos, cuyo nivel freático desciende tanto que es contaminado por agua salobre, o por la progresiva acumulación de sales provenientes del riego con aguas duras.

Las estimaciones varían, pero aproximadamente la mitad de las tierras de regadío del planeta están bajo la influencia de la salinización o la alcalinización (Szabolcs, 1992), siendo cada vez mayor el ritmo de crecimiento. Ejemplos claros pueden encontrarse en zonas como California, donde aproximadamente la mitad del área de cultivo está afectada por la salinidad, Pakistán, la cuenca mediterránea, Australia y el sur de Asia (Lewis, 1984; Malik et al., 1986).

Como ya se ha explicado en el apartado 1.1 los efectos de la sal, no sólo provocan una menor productividad, sino que pueden acabar con todo un tipo de cultivariedad en una zona determinada. Es decir la salinización de estos territorios provoca que los agricultores deban cambiar algunos cultivos muy productivos y sin halotolerancia, por cultivos con menos tasa de producción, pero con más tolerancia ante la presencia de sales. Este factor ha sido propuesto como uno de los principales factores que provocó el declive de culturas tan importantes como la sumeria, donde estudios paleobotánicos, han demostrado que los agricultores fueron cambiando sus cultivos hacia variedades más halotolerantes (menos productivas) (Jacobsen & Adams, 1958). Esto provocó que la disponibilidad de alimento fuera menor y se produjeran éxodos poblacionales hacia zonas sin esos problemas. También se ha documentado el gran uso del regadío que daban los agricultores de esta época a sus cultivos, debido a la enorme existencia de canalizaciones y acueductos localizados (Jacobsen & Adams, 1958).

Por tanto, este es un problema de especial gravedad a nivel económico, pero también a nivel ecológico, ya que esta salinización también provoca que las especies circundantes a una zona antrópicamente salinizadas, no puedan volver a colonizar ese terreno una vez se abandone el cultivo por su escaso interés económico, fomentándose aún más el fenómeno de desertificación.

1.3.2 EL PROBLEMA DE LA SEQUÍA

Las predicciones del cambio climático auguran un futuro pesimista. A las ya abundantes millones de hectáreas desertificadas o con serios problemas de disponibilidad de agua, hay que sumar las que se verán afectadas debido a este cambio en el futuro. Aunque las estimaciones no siempre coinciden, se considera que en los últimos 50 años la temperatura media ha aumentado en 0,6°C (Walter et al., 2002), y que esta podría incrementarse de 1 a 3 grados centígrados en los próximos 50 años. A este aumento, que provocaría un aumento significativo en la evapotranspiración del suelo, habría que sumarle también un descenso en la cantidad de precipitaciones en determinadas zonas, que teóricamente provocaría la desertificación de las zonas actualmente clasificadas como áridas y semiáridas, y la transformación de las secas en áridas (Brown et al., 1997).

Como ya se ha indicado en el apartado 1.2, las consecuencias de la sequía no son únicamente de descenso en la productividad, sino que si la sequía es severa, se produce la muerte vegetal. Así como ya se ha indicado en el apartado anterior los agricultores se verán obligados a sustituir sus productivos cultivos, por variedades más tolerantes a estrés hídrico, con la consiguiente pérdida de productividad que esto conlleva.

1.3.3 IMPORTANCIA DE LA MEJORA VEGETAL: USO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

La necesidad humana de obtener cada vez más y mejores alimentos, ha sido una de las grandes impulsoras del desarrollo de las distintas culturas, así como el progreso de las mismas, llegando incluso a los ilimitados niveles de sofisticación que dicha actividad tiene en nuestra actual sociedad. Esta actividad se remonta hace 8000-10000 años (Heiser, 1990), cuando de forma independiente en varias zonas del planeta, se pasó de sociedades cazadoras y recolectoras, a sociedades capaces de cultivar la tierra y domesticar animales, y fue promovida presuntamente por un aumento demográfico importante (Cohen, 1993).

Este incremento de la producción agrícola provocó a su vez un aumento en la población que pasó a ser más sedentaria. El hecho de que utilizarán menor tiempo en obtener alimentos, provocó que también dedicaran tiempo a procesarlos y diversificarlos aún más.

Actualmente y sin tener en cuenta problemáticas políticas, existe una necesidad creciente de crear alimentos con características más contundentes, como con mayor duración

de almacenaje o con un poder nutricional más poderoso, para poder así hacer frente al exponencial aumento en la demografía, que muchos gobiernos son incapaces de frenar, y otros simplemente se encargan de fomentar sin garantizar la posibilidad de que sus habitantes puedan alimentarse mínimamente.

Es por tanto un deber y una virtud de algunos investigadores el intentar crear este tipo de alimentos. Teniendo en cuenta que las limitaciones de la mejora clásica impiden a esta actividad hacer frente al vertiginoso aumento en la demanda, y sin olvidar la enorme importancia que aún posee, crece la importancia de mejorar y regularizar la creación de organismos manipulados genéticamente, es decir, alimentos transgénicos. Quizá estos alimentos no son la panacea de los problemas del planeta pero si son una clara solución a este problema.

Existen actualmente muchas voces críticas al uso, e incluso a la investigación de estos alimentos. Pero estas voces, ignorando en muchas ocasiones lo que en realidad es un alimento transgénico, parecen no tener en cuenta el imparable aumento demográfico, que se cree se estabilizará en torno al doble de la población actual (Organización de Naciones Unidas, 1998), provocando a su vez un notable aumento de la demanda alimenticia (Johnson, 2000). Aparte de esto, aumentará la demanda en la calidad y variedad de dichos productos (Dyson, 2000), y todo esto sin aumentar la superficie de suelo cultivado, debido también a indisponibilidad de agua para riego y el aumento excesivo e injustificado de la urbanización de zonas rurales.

Pero antes de la obtención de dichos alimentos genéticamente manipulados, otras han sido las técnicas usadas que se pueden englobar en el campo de la biotecnología, dejando atrás la mejora clásica. Se trata de técnicas como la mutagénesis, tanto dirigida como azarosa o de técnicas de cultivo “in Vitro” (Fusión de protoplastos, obtención de haploides, dihaploides y poliploides, regeneración de plantas a partir de un tejido, selección de embriones, etc...), que han conseguido poder crear variedades imposibles en la Naturaleza y en un periodo razonablemente reducido de tiempo.

Pero sin duda ha supuesto un hito en esta disciplina el desarrollo de la Ingeniería Genética. Con estas técnicas se pueden identificar y caracterizar genes, y otros elementos genómicos concretos, en cualquier organismo, y expresarlos en otros distinto, llegando también a poder variar la expresión de genes endógenos en una misma planta, si es lo que se desea. Pero esto no queda aquí, el potencial de este conjunto de técnicas es tal, que se pueden crear genes u otros elementos genómicos de manera artificial, dejando el listón de creación de esta técnica tan alto, que quizá aún no seamos capaces de comprender dónde se encuentra.

Pocas son aún las variedades transgénicas que se pueden comercializar, destacando variedades que poseen la toxina Bt de *Bacillus turingensis* con actividad insecticida (Betz et al., 2000) o las resistentes a diferentes herbicidas (De Block et al., 1987), pero numerosos son los logros obtenidos por los investigadores científicos en este campo que aún están por hacerlo. Entre ellos destacan todo tipo de plantas resistentes a plagas (Solomon-Blackburn & Barker, 2001; Lovëi and Arpaia, 2005), plantas con eficacia fotosintética mejorada (Ku et al., 1999), plantas utilizadas en biorremediación (Cherian and Oliveira 2005) plantas utilizadas para la fabricación de medicinas (Han et al 2006), o el arroz dorado que posee en su endospermo enormes cantidades de β -caroteno, precursor de la Vitamina A (Ye et al., 2000).

1.3.4 USO DE SISTEMAS MODELOS EN BIOLOGÍA

Una vez expuesto el problema provocado tanto por la salinidad, como por la sequía, es deber de las personas que intentamos dedicarnos a la investigación intentar resolver este problema, utilizando en la medida de nuestras posibilidades, todo tipo de técnicas biotecnológicas. Pero a la hora de realizar un abordaje científico de cualquier problema biológico, existe otro escollo que hay que salvar, se trata de la enorme diversidad biológica existente. Es decir, a la hora de realizar el trabajo experimental hay que decidir que taxón es el empleado para realizar dicha tarea, así los resultados podrían ser reproducibles y se intentará que sean exportables a los taxones más cercanos. Así, podemos encontrar ejemplos de especies que suelen representar a su grupo, y que han sido escogidas por motivos diversos, como *Drosophila melanogaster* en artrópodos, o *Saccharomyces cerevisiae* en levaduras. Aunque hay que indicar que existen autores que prefieren usar otras del mismo grupo y la universalidad de los datos obtenidos no está siempre garantizada.

Concretamente en plantas, la especie que se suele usar como modelo es *Arabidopsis thaliana* (Meyerowitz, 1989), siendo también la escogida en este trabajo. Entre sus características más ventajosas se encuentran la autofecundación, un ciclo vital corto (menos de dos meses), una elevada producción de semillas (>10.000 semillas/planta), un genoma pequeño (120 Mb/haploide) y un alto porcentaje de DNA no repetitivo (80-90%). Además, su uso como sistema modelo en los últimos años ha contribuido enormemente a incrementar su valor como herramienta biológica. Así, por ejemplo, el aumento en el número de marcadores moleculares en su genoma ha facilitado la ardua tarea de aislar genes mutados. Por otro lado, la posibilidad de ser transformada simple y eficientemente (Bent,

2000) ha permitido el uso de plantas transgénicas en estudios de cualquier tipo. Finalmente, el hecho de ser la primera planta superior cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) ha decidido definitivamente su uso como sistema modelo en biología molecular de plantas superiores.

1.4 ANTECEDENTES Y TRABAJO PREVIO

Para conocer más acerca de los efectos de la sal en plantas y sus mecanismos de tolerancia, se pueden realizar varios abordajes. En primer lugar existe la posibilidad de realizar un abordaje a pequeña escala, es decir intentar clonar genes concretos de función halotolerante conocida, para transformar plantas sensibles a sal y otorgarles tolerancia, a la vez que se podría conocer aún más el mecanismo de estos genes. Pero en la época que nos encontramos existen técnicas que nos permiten realizar técnicas de ingeniería genética a gran escala, las cuales nos permitirán conocer la función de genes desconocidos, así como la creación de plantas halotolerantes. Así, existen técnicas que desconociendo la naturaleza de los genes donde se actúa, intentan observar un fenotipo concreto, que en el caso que nos interesa, es un fenotipo relacionado con halotolerancia o halosensibilidad. Podemos poner como ejemplo, la técnica de “activation-tagging” (Weigel et al., 2000), que permite poner bajo la acción de un promotor fuerte, genes de expresión débil, cuya sobreexpresión otorga a la planta una cierta característica fenotípica. Gracias a esta técnica se han conseguido aislar genes de halotolerancia en *Arabidopsis thaliana* (Bohnert et al., 2001).

También y con la finalidad de encontrar genes cuya pérdida de función provoque mayor sensibilidad, se puede realizar un abordaje inverso, es decir, insertar construcciones de t-DNA en el genoma, que impidan la correcta expresión de un gen por planta. Después se someterá a cada planta a análisis fenotípico y si interesa se analizará el gen donde se ha insertado el t-DNA (Alonso et al., 2003). En el caso del estrés salino e hídrico, esto nos permitirá conocer mejor algunas dianas de la toxicidad iónica.

Se remonta más aún en el tiempo el uso de plantas halófilas como fuente de genes de este tipo, aunque es en esta época cuando se han mejorado las técnicas de ingeniería genética y la inserción de genes se hace a gran escala.

Otro abordaje, también a gran escala, es el que utiliza micromatrices de DNA, para la observación de la tendencia que tiene la expresión de determinados genes, a la hora de someter a la planta a una determinada situación, en nuestro caso, ocurriría con tratamientos

estresantes salinos e hídricos. Así lograremos ser capaces de observar la reacción de la expresión de cientos de genes a la vez y saber cuáles pueden estar implicados en las respuestas a estos estreses.

Pero, en lo que respecta al presente trabajo, el abordaje comenzó, cuando genes de *Arabidopsis thaliana* provenientes de una biblioteca de plántulas, se sobreexpresaron en *Saccharomyces cerevisiae* (Forment et al., 2002). Posteriormente se realizó un “screening” funcional de clones que presentaban tolerancia a LiCl. Se obtuvo un total de 7 clones distintos que presentaban esta característica, pero estos correspondían concretamente sólo a tres genes. Curiosamente estos tres genes resultaron estar relacionados con el procesamiento de RNA. El primero de ellos el *AtUIA*, un gen que codifica para una proteína que forma parte del spliceosoma (Simpson et al., 1995) y posee un dominio de reconocimiento y unión a RNA. El siguiente de ellos, fue un clon parcial del gen *AtSRL1*, que codifica para una proteína con dos dominios, el primero es un dominio de altas repeticiones Arginina-Serina, RS (es el dominio que se aisló), y el segundo es un dominio PRP38, supuestamente relacionado con el splicing. Por último, se trata del gen escogido para la realización de este trabajo, el gen *AtRCY1*, codificante para una proteína con dos dominios, un dominio Ciclina L, de función desconocida, y un dominio RS, típico de proteínas encargadas del procesamiento de RNA.

Concretamente los dos últimos genes contribuyeron con tres clones tolerantes y el *AtUIA* sólo con uno, comprobándose después que cuantitativamente la tolerancia mostrada por este último era inferior a los otros dos (Forment et al., 2002)

Aunque en *Saccharomyces* no existe splicing alternativo propiamente dicho, si existen proteínas con dominios RS (Npl3p, Nrd1p, Gbp2p y Hrb1p), con función poco clara. Es más, se sabe que la enzima de la levadura Sky1 es capaz de fosforilar estos dominios, comprobándose también (Forment et al., 2002) que si no hay fosforilación del dominio RS de SRL1, no hay tolerancia.

Se comprobó en el mismo trabajo, que los niveles de Li⁺ en el interior de la levadura eran iguales a los silvestres sin y con tratamiento salino, por lo que se descartó que la sobreexpresión de dichos genes interviniera en procesos de mantenimiento del equilibrio homeostático.

Después, y al clonar el dominio RS del gen *SRL1* en su organismo de origen, *Arabidopsis thaliana*, bajo el promotor del 35S del virus del mosaico de la coliflor, se observó que también en este caso la sobreexpresión confería tolerancia a sal (Forment et al., 2002).

1.4.1 ELECCIÓN DE RCY1

Quedaba entonces por conocer que ocurría con RCY1 si se sobreexpresaba en plantas de *Arabidopsis thaliana*, e intentar descifrar el aspecto quizá más importante, cuál es el mecanismo que provoca que la sobreexpresión de dichos genes confiera tolerancia a sal. Con estas premisas se escogió este gen, RCY1, y se comenzó su caracterización en *Arabidopsis thaliana*, cuyos datos quedan reflejados en el presente trabajo.

La función biológica de este gen es aún desconocida, aunque al existir homólogos en humanos, se tienen algunos datos acerca de cuál puede ser ésta en este organismo.

Se sabe que un anticuerpo contra RCY1 es capaz de inhibir el segundo paso del splicing, y que la proteína recombinante, es capaz de estimular el splicing en condiciones subóptimas (Dickinson et al., 2002). Por tanto ya tenemos la prueba de que al menos en humanos, esta proteína se relaciona con el splicing, pero el nivel a que esto ocurre está aún por descubrir. Esto se debe a que también se conoce su interacción con el dominio carboxi-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II cuando está fosforilada (Yang et al., 2003; de Graaf et al., 2003), llegando incluso a ser tan importante esta relación que el anticuerpo contra RCY1, que coimmunoprecipita a su quinasa, es capaz de coimmunoprecipitar a la quinasa del dominio CTD de la polimerasa II (Dickinson et al., 2002).

Si seguimos observando sus características en humanos, observamos que se expresa en todos los tejidos con sus dos dominios, a excepción del tejido testicular, en donde también se expresa y de forma masiva, una variante sólo con el dominio ciclina (de Graaf et al., 2003).

También comprobamos que esta proteína es muy importante en la fisiología humana, al conocer que es capaz de inducir apoptosis en células de hepatocarcinomas (Yang et al., 2003), siendo esta calificada como un posible oncogen en cáncer de cabeza y cuello (Redon et al., 2002).

Aún conociendo todos estos datos, su función es desconocida, indicando algunos autores que por su dominio ciclina y su inducción de apoptosis podría estar relacionada con el ciclo celular.

Hay que indicar que aunque se sabe que RCY1 posee homólogos en otros organismos, no se ha publicado datos acerca de su mecanismo de acción en estas especies.

1.5 PROTEÍNAS TIPO SR O “SR LIKE”

1.5.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES

Estas proteínas constituyen una amplia familia de proteínas caracterizadas únicamente por poseer un dominio rico en dipéptidos RS/SR (Arginina-Serina), aunque más concretamente, lo más repetido es un dipéptido que alterne la arginina, con la ya nombrada serina, glutámico o aspártico (Neugebauer et al., 1995), por lo que también son conocidas como “proteínas ricas en argininas alternantes” (*alternating arginine-rich proteins*). Estas proteínas no están en general, bien estudiadas, debido principalmente a sus pocas características definitorias, ya que este dominio RS se puede combinar con otros numerosos dominios encargados de cualquier función celular.

Existe un grupo de proteínas de esta familia que sí está bien definido, se trata del grupo de las proteínas SR verdaderas. Estas proteínas se caracterizan principalmente por poseer unas características bioquímicas y funcionales comunes (Fu, 1995; Graveley, 2000). En principio, y a nivel bioquímico estas proteínas fueron descritas por su afinidad al anticuerpo monoclonal mAb 104, que reconoce a un fosfoepítipo nuclear conservado (Roth et al., 1990). También son definidas por su capacidad para ser precipitadas selectivamente mediante un protocolo de precipitación en dos pasos con sulfato de amonio y cloruro de magnesio, lo cual permite su purificación cuantitativa (Zahler et al., 1992). Finalmente su caracterización bioquímica se completa con la capacidad que poseen para complementar el ensayo de splicing “in Vitro” de extractos S100 de células HeLa, es decir, estos extractos son incapaces de completar este ensayo, ya que han sido privados de todas sus proteínas SR, y así, al añadir cualquiera de estas proteínas SR verdaderas de forma individual, si se completa el splicing “in Vitro” (Zahler et al., 1993b; Lopato et al., 1996; Valcárcel & Green, 1996).

A nivel estructural estas proteínas SR verdaderas se caracterizan por poseer, además de el dominio RS ya nombrado, aunque en este caso el dipéptido repetido en su gran mayoría es RS/SR, uno o varios dominios de unión al RNA, normalmente conocidos como RBD (por RNA binding domains) o RRM (por RNA recognition motifs) (Zahler et al., 1992; Birney et al., 1993; Fu, 1995).

El carácter modular de las proteínas SR es el que les permite llevar a cabo su función de mediación en la interacción entre el mRNA y otros factores implicados en el metabolismo del mRNA. Así, los dominios RBD determinan la especificidad de unión al RNA de las proteínas SR, jugando un papel clave en el reconocimiento de diferentes moléculas de mRNA (Cáceres & Krainer, 1993; Cáceres et al., 1997; Chandler et al., 1997; Heinrichs & Baker, 1997; Shi et al., 1997). Por otro lado, y como se verá en el siguiente apartado, los dominios RS de distintas proteínas SR participantes en la maquinaria de procesamiento del mRNA interactúan físicamente entre sí, contribuyendo de este modo a colocar dicha maquinaria en torno a la molécula de pre-mRNA y en una posición adecuada para llevar a cabo las reacciones pertinentes (Wu & Maniatis, 1993; Tronchere et al., 1997; Graveley & Maniatis, 1998; Graveley et al., 1999). A este respecto, los dominios RS actúan en unas ocasiones de modo redundante con otros dominios RS (Rudner et al., 1998; Wang et al., 1998), y en otras de modo específico (Dauwalder & Mattox, 1998).

El dominio RS constituye además un sustrato para la fosforilación por proteínas quinasas específicas para las proteínas SR (Fetzer et al., 1997; Xiao & Manley, 1997; Wang et al., 1998b, Prasad et al., 1999; Savaldi-Goldstein et al., 2000). El dominio RS fosforilado funciona entonces como una señal de localización nuclear, dirigiendo la proteína al núcleo y regulando su distribución subnuclear entre los lugares ricos en factores de procesamiento del mRNA o “nuclear speckles” y los sitios donde se lleva a cabo la transcripción y el procesamiento del mRNA (Gui et al., 1994; Colwill et al., 1996b; Cáceres et al., 1997; Gama-Carvalho et al., 1997; Misteli et al., 1998; Koizumi et al., 1999; Lai et al., 2000; Sanford & Bruzik, 2001). La fosforilación de las proteínas SR juega así un papel fundamental en la regulación de los ciclos de asociación y disociación del spliceosoma durante el splicing (Mermoud et al., 1994; Manley & Tacke, 1996; Xiao & Manley, 1998; Wang et al., 1999), y proporciona un método adicional de regulación génica para la célula (Petersen-Mahrt et al., 1999; Sanford & Bruzik, 2001).

1.5.2 FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS TIPO SR

Las funciones que pueden desempeñar estas proteínas tipo SR, son muy diversas, y dependerá en mayor o menor medida del dominio o dominios que acompañen al RS. Aunque si es cierto que, mayoritariamente, siempre suelen estar relacionadas con el procesamiento del mRNA inmaduro (Neugebauer, 1995), ya sea en la transcripción, el splicing (alternativo

y constitutivo) o incluso en el transporte núcleo-citoplasmático del mRNA (Will & Lührmann, 1997; Blencowe et al., 1999; Graveley, 2000).

Por tanto RCY1, debido a la posesión de un dominio RS, podría verse implicada en uno los procesos nombrados en el siguiente apartado.

1.6 PROCESOS EN LOS QUE PODRÍA ESTAR IMPLICADA RCY1

Debido a su naturaleza molecular, y sin conocer ningún dato acerca de la función celular de RCY1, parece que ésta esté implicada en el procesamiento general del RNA o incluso en la traducción a proteína del mismo. También se conoce que cualquiera de estos procesos pudiera ser una diana de la toxicidad iónica de la sal, es decir, un proceso que actúe como factor limitante en la tolerancia a estrés salino, por ser más sensible a sal que otros procesos (Ditch et al., 1997).

Por tanto se van a revisar brevemente los procesos de transcripción, splicing, transporte núcleo-citoplasmático y traducción, ya que en uno de estos pasos podría actuar la proteína objeto de esta Tesis.

1.6.1 TRANSCRIPCIÓN

El paso de DNA a RNA es llevado a cabo por la RNA polimerasa I, II ó III, en células eucarióticas. El tipo de polimerasa que actúe, dependerá del tipo de gen que se está transcribiendo, y los transcritos formados también se denominarán de diferentes formas, así como que tendrán diferentes funciones. Así, y de forma general la RNA polimerasa I, transcribe los RNA ribosomales, la RNA polimerasa II (RNAPII) que transcribe los genes que codifican proteínas y RNA polimerasa III que transcribe los RNA de transferencia.

En este caso, analizaremos específicamente el proceso que ejecuta la enzima RNAPII, enzima que está constituida por 8 a 14 polipéptidos. La subunidad de mayor tamaño molecular (Rpb1) posee una característica sorprendente que repercute en la integración de la regulación del proceso de transcripción. Rpb1 contiene en el extremo carboxilo terminal repeticiones de siete residuos aminoacídicos (YSPTSPS), que varían en número de 27 en levaduras a 53 en mamíferos. Cada uno de estos segmentos contiene residuos de aminoácidos que son factibles de ser fosforilados. El dominio completo de Rpb1 es denominado CTD

(carboxil terminal repeat) y posee, en general, la capacidad de asociarse a una diversidad de polipéptidos, entre los cuales encontramos proteínas que procesarán posteriormente al transcrito, proteínas reguladoras del proceso de biosíntesis de mRNA ([co]activadores, [co]represores) y proteínas que modifican la cromatina, entre otras. La unión o no unión entre ellos es regulada fundamentalmente por el grado de fosforilación de algunos residuos aminoacídicos presentes en cada hepta repetición contenida en el CTD. Este tipo de modificación es reversible, de modo que la extensión de la fosforilación del CTD es un punto de regulación crucial para el proceso global de transcripción. Entre las otras subunidades encontramos algunas que se asocian a Rpb1, especialmente Rpb2, para conformar el sitio activo del complejo RNAPII, mientras que el resto de las subunidades dan fundamentalmente soporte estructural a la enzima (Cramer et al., 2001). Este proceso de fosforilación podría ser crucial para la función de RPY1, ya que en humanos se observa la unión entre ambas, si la RNAPII esta fosforilada (Ver apartado 1.4.1)

RNAPII desencadena la biosíntesis de mRNA cumpliendo con tres etapas fundamentales. La primera etapa del proceso es el inicio, que se caracteriza por el reconocimiento de una región del promotor. La secuencia más característica de los promotores tipo II corresponde a la denominada caja TATA y se ubica a una distancia bastante regular, cercana a 30 pares de bases, aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. La segunda etapa, denominada elongación, conlleva la biosíntesis de una molécula de mRNA, la cual es acabada en la etapa de terminación que coincide con la liberación de la RNAPII del DNA molde.

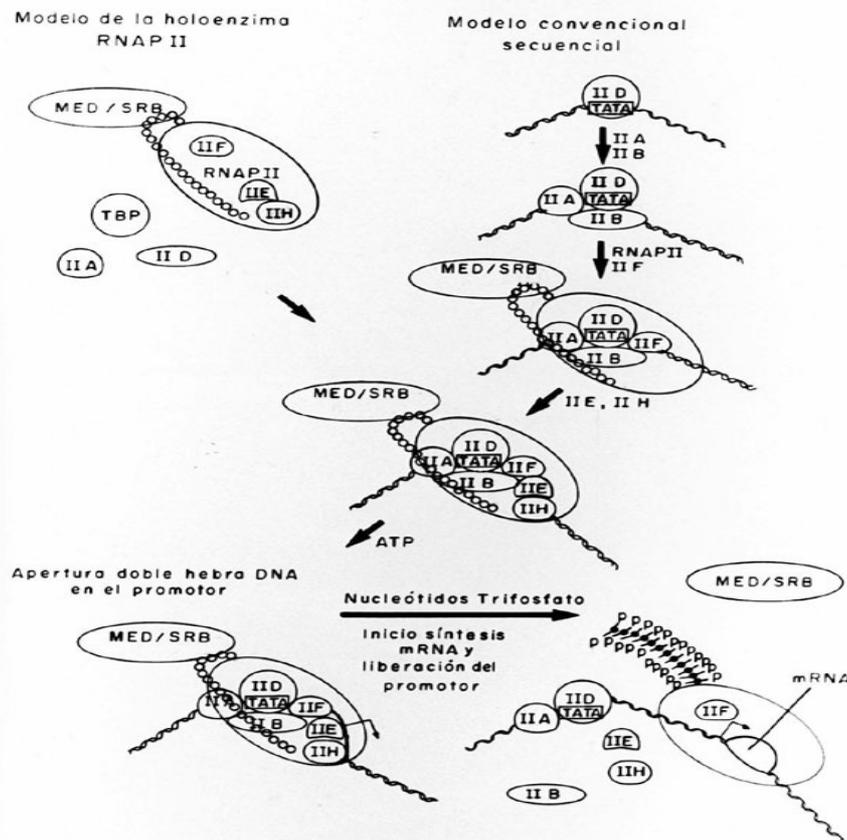
A pesar de que la enzima es multimérica, carece de la capacidad de iniciar el proceso de transcripción en forma específica. En los últimos tiempos se han hecho enormes esfuerzos experimentales que han permitido identificar aquellos factores proteicos requeridos por la RNAPII para que el inicio de la transcripción ocurra en un nivel basal y en forma exacta a partir del sitio de inicio del promotor. Es así como en organismos eucariotas tan diversos como humano, rata, *Drosophila melanogaster* y levadura, entre otros, se ha identificado a partir de extractos celulares un grupo de polipéptidos conservados en estructura y función. La RNAPII al ser suplementada con estos polipéptidos da inicio específicamente a la biosíntesis de un mRNA. Estos factores son denominados específicamente según la siguiente nomenclatura: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH. Muchos de estos factores contienen varias subunidades y constituyen en total cerca de 30 polipéptidos (Hampey, 1998). En forma colectiva se denominan factores generales de transcripción (GTFs) y al ser comunes para la expresión de la mayoría de los genes de tipo II, quizás de todos, se sugiere

que la etapa de inicio es extraordinariamente conservada entre diversos organismos eucariontes.

La etapa de iniciación de la transcripción se caracteriza por la formación del complejo de preiniciación (PIC), que consiste en un complejo formado por RNAPII y los GTFs unidos al sitio promotor (Maldonado and Reinberg, 1995). La forma mediante la cual se forma el PIC en el sitio promotor se puede explicar mediante dos modelos: el modelo secuencial y el modelo de la "RNAPII holoenzima". El modelo convencional secuencial describe la unión paso a paso de los diversos GTFs y RNAPII de forma cooperativa (Wu and Hampsey, 1999), es decir, la unión de un factor de transcripción favorece la asociación del siguiente. Este modelo está caracterizado por una serie de eventos ordenados (Ver figura 3). Por otra parte, el segundo modelo describe que la RNAPII está asociada previamente con distintos GTFs y es capaz de unirse al promotor en un solo paso. De una u otra forma, una vez establecido el PIC en la región promotora ocurre un fenómeno crucial, que consiste en la fosforilación masiva del dominio CTD de Rpb1 por el factor TFIIH, evento que coincide con la apertura de la doble hebra de DNA. Ocurre en forma concomitante el inicio a la biosíntesis de mRNA que requiere tanto de los nucleósidos trifosfatos como del cofactor magnesio (ion Mg^{2+}).

Fig. 3: Modelos alternativos de la formación del complejo de preiniciación (PIC).

El modelo convencional secuencial (b), que considera la asociación secuencial cooperativa de cada uno de los GTFs y de la RNAPII en el promotor, mientras el modelo de la RNAPII holoenzima (a) contempla que varios de los GTFs ya están preensamblados con la RNAPII y su unión al promotor ocurriría tan solo en un paso. Una vez formado el PIC, el TFIIH fosforilará el dominio CTD de Rpb1 a expensas de la hidrólisis de ATP, evento que coincide con la apertura de la doble hebra del DNA en el promotor. La RNAPII comenzará la biosíntesis de mRNA, si en el medio existe los sustratos nucleósidos trifosfatos y el cofactor ion magnesio. En la etapa de elongación la RNAPII se encuentra en un estado hiperfosforilado y el complejo MED es liberado junto con algunos GTFs



Hasta este momento hemos analizado la expresión génica en un nivel basal, pero debemos estudiar cómo ocurre el proceso cuando un gen es activado en respuesta a una señal fisiológica.

La activación de la transcripción en respuesta a una señal fisiológica es llevada a cabo por los activadores, moléculas que dirigen la regulación de la expresión de un gen específico. Este tipo de polipéptidos se une a secuencias específicas del DNA de la región promotora, las cuales se denominan secuencias intensificadoras y están localizadas aguas arriba o aguas abajo del sitio de inicio de la biosíntesis de mRNA. Los activadores están constituidos por diferentes dominios que incluyen un segmento que se une directamente a la doble hélice de DNA, el cual está separado del otro dominio que actúa estimulando la actividad del complejo de la RNAPII (Triezenberg, 1995). Este tipo de regulador de la transcripción se clasifica de acuerdo a la composición aminoacídica, dado que existen residuos aminoacídicos predominantes en ellos, tales como: glutamina, prolina e isoleucina, entre otros. Normalmente estos segmentos, más aquellos ricos en aminoácidos de carácter hidrofóbico, permiten establecer contactos directos con la RNAPII, los GTFs y los coactivadores. Todas estas interacciones son de naturaleza dinámica, producto de las cuales ocurren cambios conformacionales en una proteína o en un conjunto de ellas. Este tipo de asociaciones reclutaría a la holoenzima RNAPII a la región del promotor presente en el molde, con la concomitante activación de la biosíntesis de un mRNA dado.

La RNAPII holoenzima, además de contener los GTFs, contiene otros polipéptidos asociados que conforman el complejo Mediador/ SRB (MED), el cual es fundamental para la respuesta de activación de un gen (Thomas and Tyers, 2000). Este complejo en general puede ser considerado como un panel de control transcripcional, el cual está integrado por proteínas activadoras y represoras y responden a modificaciones que determinan la regulación de la transcripción. El complejo MED representa una interfase conservada, entre las proteínas activadoras y la maquinaria de transcripción basal de genes tipo II, que ya hemos analizado. Este complejo estaría constituido por cerca de 20 polipéptidos y puede encontrarse en un estado libre, o bien, asociado a la RNAPII a través del CTD. Al estar asociado al complejo de la RNAPII ejerce su función que es fundamentalmente determinar la ocurrencia del evento de transcripción y determinar la frecuencia del proceso una vez iniciado. Con la información que se cuenta hoy en día, es posible inferir acerca de la composición del complejo MED, pudiendo ser que existan subunidades específicas para un tipo celular en particular, o bien, que existan moléculas que conformen temporalmente el complejo MED de acuerdo al estado de diferenciación de aquella célula.

Por último, existe un tipo de regulación global de la transcripción cuya actividad recae sobre otro blanco diferente a los ya mencionados. Recordemos que el DNA se encuentra compactado en el interior del núcleo, es decir, se "enrolla" alrededor de proteínas denominadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) constituyendo lo que se denomina el nucleosoma. Estas unidades se compactan con la ayuda de otras proteínas para constituir la cromatina. El nucleosoma representa un impedimento de tipo físico, por cuanto puede dificultar el acceso a la maquinaria basal de la RNAPII, del complejo MED y de los activadores o represores. Existen algunas enzimas que poseen la capacidad de modificar a las histonas mediante acetilación (acetilasas de histonas), producto de lo cual ellas pierden reversiblemente su estructuración sobre el DNA. Al hacer estas asociaciones más inestables, se cree que se establece un lapso en el cual la maquinaria basal de la RNAPII podría competir por la unión al promotor, permitiendo en forma transitoria la expresión génica. La situación se restablece mediante la función de aquellas enzimas con actividad contraria (deacetilasas de histonas), las cuales modifican las histonas al estado nativo, logrando la compactación natural de ese segmento de DNA modificado inicialmente. Otro tipo de actividad radica en diversos complejos polipeptídicos que poseen la actividad de desplazar transitoriamente los nucleosomas con el objetivo de desplazar el impedimento físico y facilitar el paso a la maquinaria de inicio o de elongación de la transcripción. Estos complejos, como por ejemplo SWI/SNF, NURF, CHRAC y otros, ejercen su actividad en un modo dependiente de energía la cual proviene de la hidrólisis de ATP. Estos eventos son de naturaleza dinámica, por cuanto una vez ocurrido el proceso de transcripción la organización nativa de la cromatina se recupera.

1.6.2 PROCESAMIENTO DE INTRONES O SPLICING

El transcrito primario debe sufrir una serie de modificaciones previas a su transporte al citoplasma como RNA mensajero maduro, modificaciones que se conocen con el nombre de procesamiento del mRNA, y que comprenden: 1) la adición de una 7-metil-guanidina en su extremo 5', o *capping*, 2) la eliminación de los intrones, o *splicing*, y 3) la sustitución de un segmento 3' terminal por una cola de adeninas, o poliadenilación. Estos procesos se encuentran además acoplados entre sí y al proceso mismo de la transcripción (Greenleaf, 1993; McCracken et al., 1997b; Neugebauer & Roth, 1997b; Bentley, 1999; Cramer et al., 2001; Fong & Bentley, 2001; Maniatis & Reed, 2002; o Proudfoot et al., 2002), de modo que

las maquinarias celulares encargadas de los mismos se asocian a la molécula de RNA naciente poco después del inicio de la transcripción y llevan a cabo su función durante la elongación del transcrito primario. Esto ha llevado a algunos autores a denominar transcriptosoma al conjunto de proteínas y moléculas de RNA que componen la unidad de transcripción, entendida ésta como la producción de una molécula de RNA maduro (Halle & Meisterernst, 1996; Gall et al., 1999).

El procesamiento del pre-mRNA es, pues, una etapa esencial en el proceso de la expresión génica en eucariotas. Además, como veremos en apartados posteriores, mecanismos muy importantes de regulación de la expresión génica actúan a este nivel.

1.6.2.1 ADICIÓN DE UNA CAPERUZA O CAPPING

El proceso de capping consiste en la adición de una caperuza (cap) $m^7G(5')$ -ppp(5')N₁ al extremo 5' del mRNA naciente (Shatkin, 1976). La reacción de capping tiene lugar en tres pasos, catalizados actividades enzimáticas específicas (Ver Figura 4) (Shuman, 1995; Shuman, 2001). En primer lugar, una trifosfatasa de RNA elimina el fosfato terminal del nucleósido trifosfato en posición 5'. Luego, una guanidiltransferasa de RNA reacciona con GTP para formar un intermedio covalente enzima-GMP y transferir este GMP al extremo 5' difosfato del pre-mRNA, formando un enlace 5'-5' fosfo-diéster característico de esta estructura. Por último, una (guanina-7)-metiltransferasa de RNA añade un grupo metilo procedente de S-adenosilmetionina a la posición N7 de la guanina terminal, pudiéndose metilar también los siguientes nucleótidos (Ver figura 4).

Esta primera modificación del transcrito primario de mRNA tiene lugar al poco de iniciarse la transcripción (Rasmussen & Lis, 1993), gracias a la interacción de las enzimas implicadas en el capping con el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA Pol II (Cho et al., 1997; McCracken et al., 1997; Yue et al., 1997; Ho et al., 1998; Schroeder et al., 2000), o con otros factores del complejo de transcripción (Pei & Shuman, 2002), y tiene el efecto de estimular los procesos posteriores de splicing (Fresco & Buratowski, 1996; Lewis et al., 1996; Schwer & Shuman, 1996), transporte al citoplasma (Hamm & Mattaj, 1990) y traducción (Shatkin, 1985). Es además esencial para el reconocimiento del mRNA por la maquinaria de síntesis de proteínas (Sonenberg, 1993), para la estabilidad del mRNA (Furuichi et al., 1977) y para el control de su degradación (Beelman & Parker, 1995; Martínez et al., 2001).

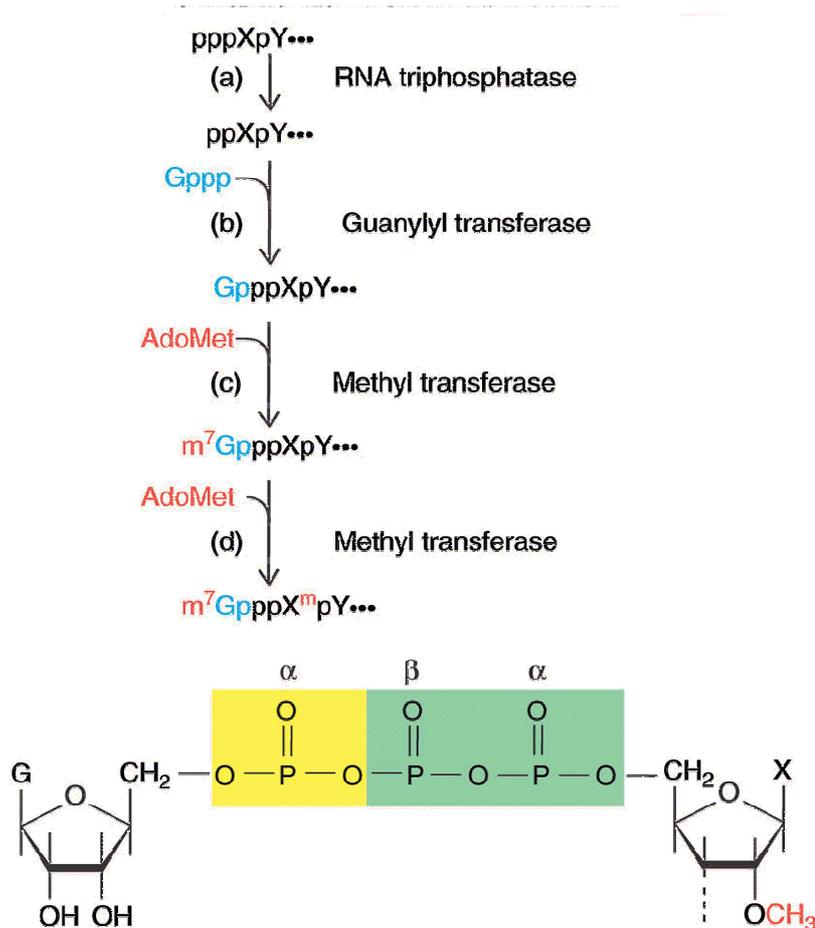


Fig. 4: Ruta enzimática del capping. Se muestra las modificaciones que realizan las diferentes enzimas para poder añadir la caperuza $m^7G(5')-ppp(5')N_1$.

1.6.2.2 PROCESAMIENTO DE INTRONES O SPLICING

En las células eucariotas, la mayor parte de los genes se encuentran interrumpidos por zonas de DNA no codificantes que, aunque son transcritas a RNA (formando parte del transcrito primario), deben ser eliminadas de éste antes de que sea exportado al núcleo para su traducción. La eliminación de estos fragmentos de RNA aparentemente inservibles, o intrones, así como la unión de los fragmentos codificantes, o exones, resultantes es un proceso altamente conservado en la evolución conocido como splicing (Moore et al., 1993; Burge et al., 1999). Dicho proceso debe realizarse de forma absolutamente precisa en cuanto a los sitios de corte y unión en la secuencia del mRNA, ya que, de lo contrario, se podría alterar la pauta abierta de lectura (ORF, por "open reading frame"), con los consiguientes cambios en la secuencia, tamaño y función de la proteína codificada. De hecho, el efecto más probable de un error en la selección de los sitios de splicing sería la producción de proteínas truncadas inactivas, debido a la aparición prematura en el mRNA final de codones de

terminación. Esta necesaria precisión en la identificación de los sitios de splicing se consigue mediante interacciones específicas entre secuencias en el mRNA inmaduro y diferentes factores de la maquinaria celular encargada de llevar a cabo este proceso (Krämer, 1996; Brown & Simpson, 1998).

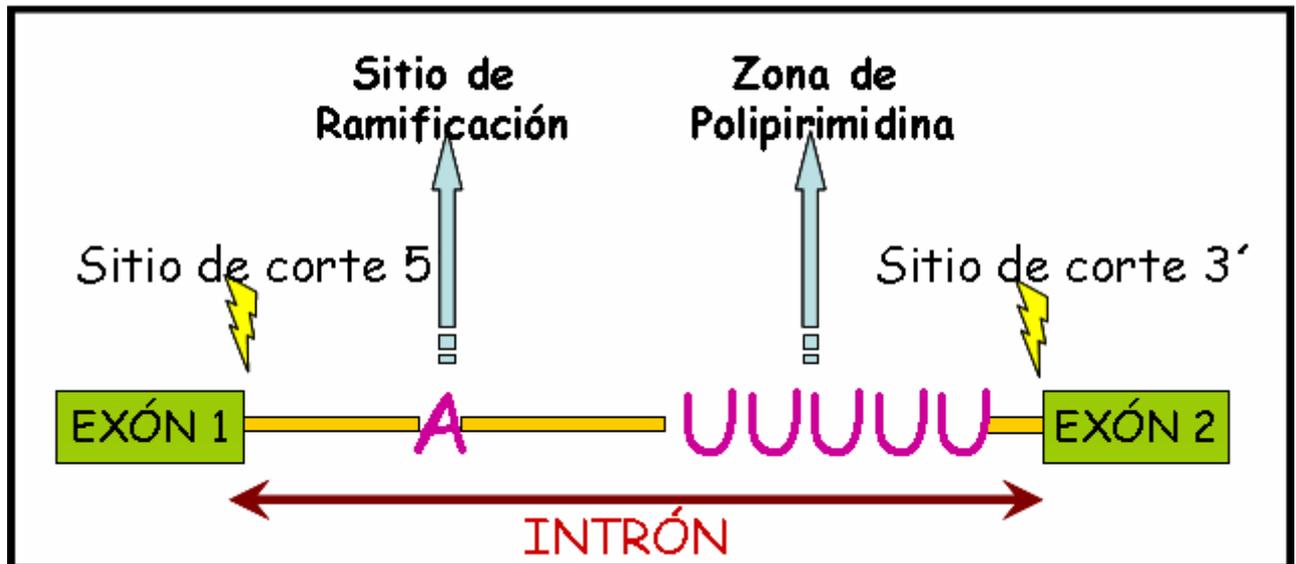


Fig. 5: Representación esquemática de las zonas de RNA inmaduro que delimitan la extensión del intrón y participan en el mecanismo de splicing.

En la figura 5 se pueden ver las zonas de los intrones que delimitan su extensión y participan en el mecanismo de corte y unión:

- Sitio de corte 5': El extremo 5' del intrón toma la prácticamente invariable forma de /GU. En *S. cerevisiae*, la conservación se extiende a los 6 nucleótidos del extremo 5', que suelen conformarse a la secuencia consenso /GUAUGU (Rymond & Rosbash, 1992). En plantas superiores y mamíferos, la secuencia consenso toma la forma de AG/GUAAGU, aunque la conservación es mucho menor e incluso existen algunos intrones (por ejemplo, el 0,5% de los intrones de *Arabidopsis*) que comienzan por /GC (Simpson & Filipowicz, 1996).
- Sitio de corte 3'. El trinucleótido YAG/ (pirimidina AG/) es apenas invariable en el extremo 3' de los intrones, mientras que los nucleótidos adyacentes se adaptan a la secuencia consenso UGYAG/GU en plantas y YAG/G en mamíferos (Simpson & Filipowicz, 1996).
- Sitio de ramificación o branchpoint: 10-50 nucleótidos por delante del extremo 3' del intrón se encuentra una adenina activa en el proceso de corte y unión de los fragmentos de mRNA denominado sitio de ramificación o *branchpoint*. Dicha adenina se encuentra determinada por la secuencia de nucleótidos adyacentes, tomando la casi invariable forma de UACUAAC en *S. cerevisiae* (con el subrayado

indicando la adenina activa), y variando más, aunque con la secuencia consenso YURAY (donde R es cualquier purina), en mamíferos y plantas superiores (Brown & Simpson, 1998).

- Zona de polipirimidina. Inmediatamente por delante del sitio de corte 3' existe en los intrones de vertebrados una secuencia muy rica en pirimidinas requerida para un *splicing* eficiente. En algunos intrones de *S. cerevisiae* y en plantas, este lugar es rico en U, y parece importante para el reconocimiento del sitio de corte 3' (Baynton et al., 1996).

Junto a todo esto, en plantas es muy importante el elevado contenido en adeninas y uracilos de los intrones en comparación con el de los exones, lo cual ayuda a definir a aquellos. Es ésta una característica especial de los intrones de plantas que constituye una de las principales diferencias entre los mecanismos de reconocimiento de intrones y exones en plantas y los de animales y levaduras, por lo demás altamente conservados (Simpson & Filipowicz, 1996).

Existen además unos pocos intrones en metazoos y plantas con secuencias consenso diferentes en sus extremos 5' y 3' (/AT y AC/, respectivamente). El hecho de que dichos intrones sean eliminados por una maquinaria celular algo diferente de la encargada de procesar el resto de intrones viene a confirmar una vez más la importancia de estas secuencias para un adecuado *splicing* (Sharp & Burge, 1997; Tarn & Steitz, 1997). Por otro lado, además de los motivos mencionados en los intrones, existen en los exones determinadas secuencias que, aunque no se ajustan a secuencias consenso, parecen colaborar en el reconocimiento de los intrones adyacentes (Liu et al., 1998).

El proceso de corte y unión de la molécula de mRNA se da en dos pasos a través de sendas reacciones de transesterificación intramoleculares (Krämer, 1996). En la primera, se produce un ataque nucleofílico en el fosfato del extremo 5' del intrón por parte del grupo 2'-hidroxilo de la adenina del sitio de ramificación. Dicha reacción provoca, por un lado, el corte de la molécula del mRNA por el sitio de *splicing* 5', liberando el exón 5'. Por otro lado, produce la unión del extremo 5' del intrón con la adenina del sitio de ramificación a través de un inusual enlace fosfodiéster 2'-5', formando el llamado "lariat" (lazo o bucle) intermedio. En la segunda reacción, el grupo 3'-hidroxilo del exón 5' liberado en el paso anterior lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el fosfato del extremo 3' del intrón. Ello provoca, por un lado, la rotura de la molécula de RNA llamada "lariat" intermedio por el sitio de corte 3' del intrón, liberando a éste en forma de "lariat" para ser rápidamente degradado. Además,

produce la unión del extremo 3' del exón 5' con el extremo 5' del exón 3', reconstituyendo una molécula de mRNA con los dos exones ligados.

La maquinaria celular encargada de reconocer los intrones en la molécula de mRNA inmaduro y de catalizar las reacciones de splicing es un gran complejo ribonucleoprotéico altamente conservado denominado espliceosoma. Este macrocomplejo está formado por diferentes subunidades denominadas partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas ricas en uridinas (U snRNPs, por “uridylylate-rich small nuclear ribonucleoprotein particles”): U1, U2, U4/U6 y U5 snRNP (Ver figura 6). Cada U snRNP contiene una (U1, U2 y U5) o dos (U4/U6) moléculas de RNA específicas (U snRNA) asociadas a una serie de proteínas (Krämer, 1996; Burge et al., 1999). Algunas de estas proteínas, las conocidas como proteínas Sm (B, B', D1, D2, D3, E, F y G), son comunes a todos los U snRNPs, y comparten un motivo estructural que puede ser usado para identificarlas (Seraphin, 1995). Otras proteínas, en cambio, son específicas de cada U snRNP, como por ejemplo las proteínas U1A y U1-70K del U1 snRNP. Además, existe un gran número de otras proteínas extrínsecas que no forman parte de ningún U snRNP pero que son esenciales para el splicing y su regulación, tales como las proteínas hnRNP (por “heterogeneous nuclear ribonucleoproteins”) (Dreyfus et al., 1993; Krecic & Swanson, 1999), diferentes ATPasas dependientes de RNA o helicasas de RNA dependientes de ATP (Fuller-Pace, 1994) y sobretodo las proteínas SR (Fu, 1995; Manley & Tacke, 1996; Graveley, 2000; Jurica and Moore, 2003; Reddy, 2004). Además de jugar un papel en el splicing constitutivo, las proteínas hnRNPs y las proteínas SR regulan la elección entre diferentes sitios posibles de corte y unión en la molécula del mRNA inmaduro (Shen and Green, 2004), pudiendo dar lugar a la producción de diferentes mRNA maduros (y, por tanto, a diferentes proteínas) a partir de un mismo gen. Este proceso, conocido como splicing alternativo, dota a la célula de un mecanismo adicional de regulación de la expresión génica en función del tejido o del estadio de desarrollo, o en respuesta a las condiciones ambientales (Zahler et al., 1993a; Kanamura et al., 1998; Komatsu et al., 1999; Smith & Valcárcel, 2000; Cowper et al., 2001).

El espliceosoma es formado mediante una asociación ordenada de los U snRNPs y proteínas extrínsecas con la molécula de mRNA inmaduro naciente (Ver figura 5) (Krämer, 1996; Will & Lührmann, 1997; Staley & Guthrie, 1998). El espliceosoma se ensambla “de novo” sobre el mRNA inmaduro para cada uno de los intrones que se procesan. Una vez eliminado un intrón de dicha molécula de mRNA inmaduro, los componentes del espliceosoma se disocian y pasan a estar disponibles para una nueva ronda de asociación sobre un nuevo intrón en la misma u otra molécula de mRNA inmaduro. No obstante, y en contra de lo que se creía hasta hace poco, se han encontrado indicios de que los snRNPs del

espliceosoma se asocian entre sí antes de unirse a la molécula de mRNA inmaduro (Stevens et al., 2002).

El ciclo de asociación y disociación del espliceosoma comienza con la interacción del U1 snRNP con el sitio de corte 5' del intrón, merced al apareamiento de bases que se produce entre éste y el extremo 5' del U1 snRNA (Séraphin et al., 1988). Posteriormente, diferentes proteínas extrínsecas a los U snRNPs se unen a la zona de polipirimidinas y al sitio de ramificación (Berglund et al., 1997), al mismo tiempo que interactúan con proteínas del U1 snRNP unido al sitio de corte 5'. Dichas interacciones tienen como resultado acercar físicamente los extremos 5' y 3' del intrón. El complejo así formado es denominado complejo de iniciación (CC, por "commitment complex") en levadura y complejo E (por "early complex") en mamíferos, por ser en este estadio donde se toma la decisión de realizar el splicing sobre una molécula de RNA y donde un intrón es definido como tal (Abovich & Rosbash, 1997).

El siguiente componente en unirse al complejo es el U2 snRNP, que se asocia al sitio de ramificación mediante apareamiento de bases entre éste y el U2 snRNA. Este paso, al igual que los posteriores, y a diferencia del anterior, requiere el consumo de ATP (Staley & Guthrie, 1998). El complejo resultante es denominado pre-espliceosoma o complejo A, y su formación requiere también de la unión de un número de factores de splicing que parecen funcionar promoviendo o estabilizando interacciones entre componentes (Krämer, 1996) entre los que se encuentran jugando un papel fundamental, las proteínas SR (Shen et al., 2004) que ponen en contacto este complejo A con el sitio de ramificación.

Por último, se unen las partículas U4/U6 y U5, previamente asociadas entre ellas, para formar el espliceosoma completo o complejo B. En él se produce entonces la disociación secuencial de las partículas U1 y luego U4 snRNP, así como un número de cambios conformacionales que tienen como resultado disponer los sitios reactivos del mRNA inmaduro en la conformación correcta para que se produzcan las reacciones del splicing, formando el espliceosoma activo, o complejo C (Simpson & Filipowicz, 1996; Murray & Jarrell, 1999). Dichos cambios requieren ATP y factores tales como helicasas de RNA y ATPasas, e implican una serie de interacciones entre el mRNA inmaduro, los snRNAs, y las diversas proteínas participantes (Moore et al., 1993; Madhani & Guthrie, 1994; Staley & Guthrie, 1998). Una vez realizadas las necesarias reacciones de corte y unión en la molécula del pre-mRNA, un complejo formado por las restantes partículas U2, U5 y U6 snRNP se separa del mRNA procesado llevándose consigo al intrón en forma de "lariat". Este es posteriormente liberado para su degradación (Chapman & Boeke, 1991), y las partículas U2, U5 y U6 snRNP se disocian para estar disponibles para la siguiente ronda de splicing sobre

un nuevo intrón (Sawa & Shimura, 1991; Arenas & Abelson, 1997). Todo esto queda resumido en la Figura 5.

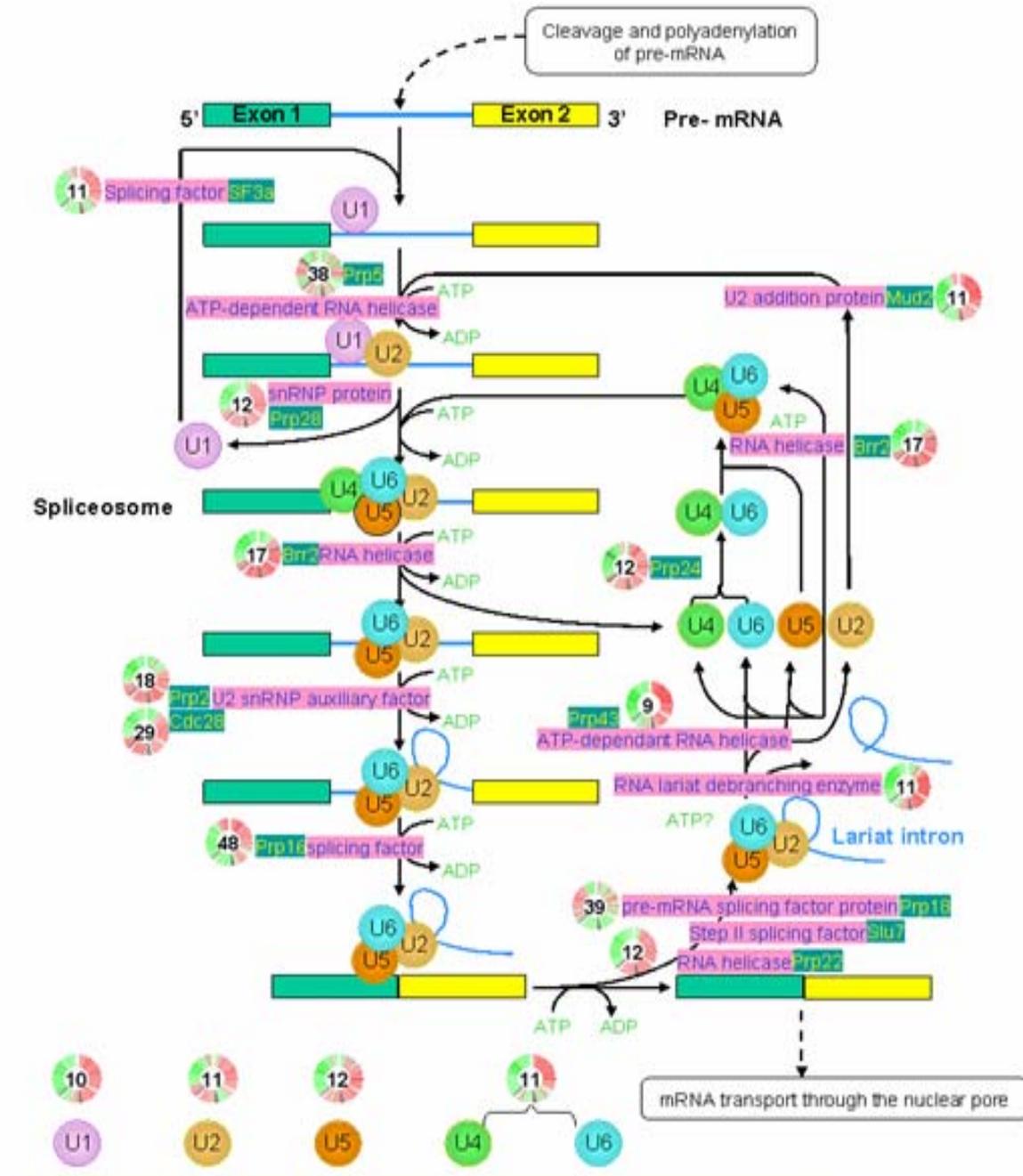


Fig. 5: Cuadro resumen de la asociación de los distintos componentes del espliceosoma

La progresión del ciclo de asociación y disociación del espliceosoma parece estar regulada tanto positiva como negativamente por fosforilación y defosforilación reversibles de algunos de sus componentes (Gui et al., 1994; Mermoud et al., 1994; Murray et al., 1999).

Como ya se ha indicado, las proteínas SR parecen ser las principales dianas de dicha regulación por quinasas y fosfatasas (Manley & Tacke, 1996; Misteli et al., 1998; Wang et al., 1998; Xiao & Manley, 1998; Prasad et al., 1999; Wang et al., 1999; Yeakley et al., 1999). Es por esto que las proteínas SR tienen una función primordial en todo este proceso (Sanford et al., 2003;)

Por otro lado, la asociación de los componentes del espliceosoma con el mRNA inmaduro, así como la subsiguiente reacción de catálisis, se realiza cotranscripcionalmente a medida que el mRNA inmaduro emerge del complejo de elongación de la RNA Pol II (McCracken et al., 1997b; Neugebauer & Roth, 1997b; Bentley, 1999). Dicho acoplamiento entre la transcripción y el splicing se consigue gracias a que el dominio carboxilo terminal (CTD, por “carboxi terminal domain”) de la subunidad mayor de la RNA pol II interactúa físicamente con diferentes factores de splicing, principalmente proteínas SR (Greenleaf, 1993; Yuryev et al., 1996; Bourquin et al., 1997), como es el caso de RCY1 al menos en humanos (Yang et al., 2003), pero también otras (Morris & Greenleaf, 2000). Estos factores de splicing pueden así reclutar eficientemente la maquinaria de splicing a los sitios de nacimiento del mRNA inmaduro (Neugebauer & Roth, 1997; Misteli & Spector, 1999; Wei et al., 1999).

El splicing se encuentra también acoplado a los procesos de capping (Fresco & Buratowski, 1996), poliadenilación (Lutz et al., 1996; Gunderson et al., 1997; McCracken et al., 2002) y transporte núcleo-citoplásmico del mRNA (Brodsky & Silver, 2000; Zhou et al., 2000; Shen et al., 2000; Le Hir et al., 2001; Palacios, 2002). Así, se ha encontrado que la proteína U1A, componente específico del U1 snRNP, además de regular la poliadenilación de su propio mRNA (Gunderson et al., 1997), interacciona con el factor de poliadenilación CPSF incrementando la eficiencia de poliadenilación “in Vitro” (Lutz et al., 1996). Del mismo modo, se ha encontrado que los factores de splicing SRp20 y SRm160, pertenecientes a la superfamilia de proteínas SR (Fu, 1995), están implicados en la regulación de la poliadenilación de determinados mRNAs (Lou et al., 1998; McCracken et al., 2002). Por último, se sabe que el acoplamiento entre el splicing y el transporte núcleo-citoplásmico del mRNA es tal que un inadecuado splicing impide un eficiente transporte del mRNA al citoplasma (Custódio et al., 1999; Luo & Reed, 1999; Cullen, 2000). Además, el proceso de splicing es decisivo a la hora de determinar la estructura y composición de los mRNPs, complejos ribonucleoprotéicos formados por el mRNA maduro y proteínas implicadas en el procesamiento y transporte del mismo. De este modo, el splicing imprime una marca sobre el mRNA que es capaz de regular la posterior traducción del mismo en el citoplasma (Matsumoto et al., 1998; Kataoka et al., 2000; Bourdon et al., 2001).

Por último, hay que decir que los estudios sobre splicing han sido realizados principalmente en células de *S. cerevisiae* y en células HeLa humanas, sistemas a partir de los cuales se pueden preparar extractos capaces de llevar a cabo la reacción de splicing “in Vitro”. No ocurre lo mismo en plantas, donde la preparación de dichos extractos es aún imposible de manera funcional. Así, en levadura se puede preparar un extracto a partir de células completas para hacer splicing “in Vitro”. (Lin et al., 1985) que, en combinación con los estudios genéticos y bioquímicos, ha contribuido enormemente al conocimiento actual sobre el splicing. Lo mismo ocurre con las células HeLa humanas, en las que el abordaje bioquímico se ve complementado por la capacidad de preparar extractos nucleares, competentes para el splicing “in Vitro”, o extractos S100, que carecen de las proteínas SR por la imposibilidad de extraerlas del núcleo en las condiciones de preparación y son, por tanto, inactivos en splicing (Hernández & Keller, 1983). En plantas, el hecho de que no se haya podido establecer un sistema para realizar splicing “in Vitro” ha supuesto que los estudios sobre el splicing en plantas estén mucho menos adelantados.

1.6.2.3 POLIADENILACIÓN

Otra modificación sufrida por el mRNA eucariótico antes de ser transportado al citoplasma para ser traducido a proteína es el corte endonucleolítico en un sitio específico de su región 3' (sitio de poliadenilación) y la adición en dicho lugar de una cola de adeninas o poli(A) (Colgan & Manley, 1997; Whale & Keller, 1996; Zhao et al., 1999; o Whale & Ruegsegger, 1999). El lugar exacto de corte y poliadenilación viene determinado por varios elementos en la secuencia del mRNA. Uno de dichos elementos es la llamada señal de poliadenilación, situada 10-30 bases por delante del sitio de poliadenilación. Esta señal es uno de los elementos de secuencia más conservados que se conocen, tomando la casi invariable forma de AAUAAA en mamíferos y variando más en levaduras y sobre todo en plantas (Colgan & Manley, 1997; Li & Hunt, 1997). Además de la señal de poliadenilación, existen otros elementos menos conservados situados por delante de dicha señal o detrás del sitio de poliadenilación. Los elementos situados por delante pueden faltar en los genes de mamíferos (Li & Hunt, 1997), mientras que la existencia en plantas y levadura de los situados por detrás sigue siendo controvertida (Rothnie, 1996). Por último, a pesar de resultados a favor de que la secuencia en torno al sitio de poliadenilación ayuda también a definir dicho sitio (Mogen et al., 1992), dicha influencia no está clara (Gilmartin et al., 1995). La existencia de todos estos elementos permite una regulación de la poliadenilación al

posibilitar el uso de sitios de poliadenilación alternativos y producir así mRNAs que difieren en sus extremos 3' (Colgan & Manley, 1997; Minvielle-Sebastia et al., 1998; Barabino & Keller, 1999; Zhao et al., 1999).

Por otro lado, la longitud de la cola de adeninas está altamente definida, siendo específica para cada organismo y cada molécula de mRNA. En levadura, suele tener 55-90 nucleótidos, mientras que en mamíferos tiene entre 150 y 250 (Zhao et al., 1999). Dicha longitud parece estar regulada por factores que procesan la cola de adeninas después de su formación (Brown & Sachs, 1998).

La maquinaria celular encargada de llevar a cabo las reacciones de corte y poliadenilación está formada por una serie de complejos de proteínas bastante conservados evolutivamente. Estos complejos comprenden principalmente el factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF), el factor de estimulación del corte (CstF), diversos factores de corte (CFs), la polimerasa de poli(A) (PAP) y la proteína de unión al poli(A) (PAB) (Colgan & Manley, 1997, y referencias allí citadas).

Entre las funciones atribuidas a la cola de adeninas del mRNA se encuentran las de promover el transporte del mRNA al citoplasma (Huang & Carmichael, 1996), mantener la estabilidad del mRNA (Jacobson & Peltz, 1996) o reclutar los mRNAs a la maquinaria de traducción (Sachs et al., 1997). La poliadenilación se encuentra además acoplada a los procesos de transcripción (Dantonel et al., 1997; Hirose & Manley, 1998; Barilla et al., 2001), splicing (Gunderson et al., 1997; Lou et al., 1998) y transporte al citoplasma (Huang & Carmichael, 1996; Kessler et al., 1997; Brodsky & Silver, 2000; Dower & Rosbash, 2002; Hector et al., 2002) del mRNA (Minvielle-Sebastia & Keller, 1999). Todo ello hace que la regulación de la poliadenilación pueda ser usada para modular la expresión génica de una manera específica de tejido o del estadio de desarrollo en cuestión (Colgan & Manley, 1997; Gunderson et al., 1997; Lou et al., 1998; Barabino & Keller, 1999).

1.6.3 TRANSPORTE NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO

Una vez la molécula de mRNA ha sido procesada en el núcleo, ésta debe ser transportada al citoplasma para ser traducida a proteína en los ribosomas. Aunque dicho transporte no implica necesariamente una modificación de la molécula de mRNA y, por tanto, no puede ser incluido estrictamente hablando en el procesamiento del mRNA, el elevado grado de acoplamiento entre los mecanismos y factores implicados en el

procesamiento del mRNA y su transporte al citoplasma hacen aconsejable su tratamiento conjunto.

El transporte del mRNA desde el núcleo al citoplasma es un proceso activo y específico que requiere de la asociación del mRNA con una serie de proteínas que lo acompañarán en forma de complejos ribonucleoprotéicos (mRNP, por “messenger ribonucleoproteins particles”) a través del poro nuclear (para revisiones, ver Nakielny & Dreyfuss, 1997; Nigg, 1997; Stutz & Rosbash, 1998; Görlich & Kutay, 1999; Nakielny & Dreyfuss, 1999). La función de las proteínas de los complejos mRNPs es diversa. Por un lado, son las encargadas de acoplar los procesos de síntesis y maduración del mRNA con su transporte fuera del núcleo, uniéndose al mRNA inmaduro durante los procesos de transcripción, capping, splicing y poliadenilación, e identificando la molécula de mRNA como apta para su transporte al citoplasma (Kessler et al., 1997; Brodsky & Silver, 2000; Kataoka et al., 2000). Por otro lado, algunas de ellas interactúan con proteínas receptoras en el poro nuclear, funcionando como señales para el complicado mecanismo de traslocación del complejo ribonucleoprotéico a través de dicho poro (Daneholt, 1997; Rabut & Ellenberg, 2001). Siguen además actuando en el citoplasma dirigiendo el mRNA hasta los ribosomas y definiendo el proceso sufrido por la molécula de mRNA hasta el momento (Matsumoto et al., 1998; Kataoka et al., 2000). Además, existen casos descritos en los que el mRNA se almacena en el citoplasma en forma de complejos mRNPs inactivos para la traducción del mRNA, existiendo mecanismos específicos de activación para producir en el momento adecuado la proteína en ellos codificada (Vasalli & Stutz, 1995; Johnstone & Lasko, 2001; Smillie & Sommerville, 2002).

Una vez en los ribosomas, el complejo mRNP debe disociarse para liberar el mRNA para su traducción y para que las proteínas sean reimportadas al núcleo para una nueva ronda de exportación de mRNA. Se da así un ciclo dinámico de asociación nuclear y disociación citoplasmática que debe ser coordinado con la producción del mRNA y su transporte al citoplasma y en el que la célula debe distinguir bien entre las proteínas de transporte asociadas al mRNA y aquellas que están libres para su reimportación al núcleo (Hood & Silver, 1999).

Existen dos clases de proteínas de unión al RNA que se ha visto migran del núcleo al citoplasma y viceversa, siendo, pues, buenas candidatas para funcionar en el transporte núcleo-citoplásmico del mRNA (Stutz & Rosbash, 1998). Por un lado están las proteínas hnRNPs (Dreyfus et al., 1993; Krecic & Swanson, 1999), que, con la proteína hnRNP A1 como prototipo, han sido históricamente estudiadas como potenciales factores de transporte del mRNA (Piñol-Roma & Dreyfuss, 1992; Izaurralde et al., 1997; Nakielny &

Dreyfuss, 1997; Stutz & Rosbash, 1998; Green et al., 2002). Por otro lado, tenemos a las proteínas SR (Fu, 1995; Graveley, 2000), inicialmente identificadas como factores de splicing (Manley & Tacke, 1996) pero a las que se les ha ido atribuyendo un creciente número de funciones en otros aspectos del metabolismo del mRNA, incluyendo el transporte al citoplasma (Alzhanova-Ericsson et al., 1996; Cáceres et al., 1998; Huang and Steitz, 2001; Huang et al., 2003).

En *S. cerevisiae*, una de las proteínas implicadas en el transporte del mRNA mejor estudiadas es Npl3p (Flach et al., 1994; Lee et al., 1996). Esta proteína posee una secuencia similar a la de la proteína hnRNP A1 de vertebrados y se ha mostrado que se une al RNA poliadenilado (Flach et al., 1994; Wilson et al., 1994). Ello hace que pueda ser considerada como una proteína hnRNP de levadura (Stutz & Rosbash, 1998). Por otro lado, su dominio de unión al RNA recuerda bastante al de las proteínas SR (Birney et al., 1993). Posee además ocho dipéptidos SR/RS en su dominio C-terminal y puede ser fosforilada tanto por la quinasa de proteínas SR de mamíferos SRPK1, como por la supuestamente homóloga de levadura Sky1p (Siebel et al., 1999). Esto la hace ser considerada también una proteína del tipo de las proteínas SR en *S. cerevisiae*.

Npl3p se asocia con el mRNA en el núcleo y lo acompaña hasta el citoplasma, donde se disocia de éste para ser reimportada de nuevo al núcleo. Se han identificado ya algunas proteínas participantes en dichas rondas de entrada y salida del núcleo de Npl3p. Así, se sabe que su salida del núcleo requiere de proteínas tales como Mex67p, Mtr4p y otras asociadas al poro nuclear como Gle1p, Mtr2p, Mtr3p y Srp1p, pero no precisa otras esenciales para el transporte de otras proteínas, como Crm1p (Stade et al., 1997; Stutz & Rosbash, 1998, Cole, 2000), lo cual sugiere la existencia de diferentes rutas para la salida del mRNA del núcleo (Liu et al., 1999). Una vez en el citoplasma, Npl3p se disocia del mRNA para asociarse con Mtr10p, proteína miembro de la superfamilia de importinas β que, junto a otras como el factor Ran Ntf2p, media la reentrada de Npl3p al núcleo (Senger et al., 1998). Esta vía de entrada es además diferente de otras descritas para la reentrada al núcleo de proteínas de unión al mRNA (Pemberton et al., 1997), ofreciendo así la posibilidad de regulación diferencial de la expresión génica mediante el control del transporte del mRNA al citoplasma.

Al igual que todas las proteínas SR caracterizadas hasta el momento, que son reguladas por fosforilación (Manley & Tacke, 1996; Misteli et al., 1998; Xiao & Manley, 1998; Wang et al., 1999; Yeakley et al., 1999), Npl3p es susceptible de ser fosforilada en su dominio RS por la quinasa de proteínas SR de levadura Sky1p (Siebel et al., 1999). Dicha fosforilación se da en el citoplasma, y tiene como resultado la disociación entre el mRNA y

Npl3p, quedando éste disponible para unirse a Mtr10p y ser reimportada al núcleo (Yun & Fu, 2000; Gilbert et al., 2001). La proteína Sky1p ha sido además implicada en la tolerancia de la levadura a distintos compuestos tóxicos, como litio y espermina (Erez & Kahana, 2001), y cisplatina, carboplatina, doxorubicina y daunorrubicina (Schenk et al., 2001; Schenk et al., 2002). En humanos se cree que el proceso es inverso, y son las proteínas SR hipofosforiladas, las que se unen al poro nuclear, quedando las hiperfosforiladas listas para la unión al espliceosoma (Huang et al., 2004).

Por otro lado, muchas de las proteínas hnRNPs son metiladas específicamente en los residuos arginina de los motivos RGG (arginina-glicina-glicina) frecuentes en ellas (Liu & Dreyfuss, 1995; Valentini et al., 1999; Green et al., 2002), y, así, Npl3p es metilada por la metiltransferasa de *S. cerevisiae* Hmt1p (Henry & Silver, 1996; Siebel & Guthrie, 1996). Dicha metilación regula positivamente el transporte al citoplasma de Npl3p (Shen et al., 1998; McBride et al., 2000). Además, interfiere con la fosforilación de Npl3p por Sky1p, regulando así negativamente la interacción de Npl3p con Mtr10p y la subsiguiente reentrada de Npl3p al núcleo (Yun & Fu, 2000). Todo ello ofrece a la célula una nueva posibilidad de control de la expresión génica mediante regulación de la metilación de las proteínas hnRNP implicadas en el transporte del mRNA (Inoue et al., 2000; Yun & Fu, 2000).

Otras proteínas hnRNP de *S. cerevisiae* también implicadas en el transporte núcleo-citoplásmico del mRNA son Hrp1p, que participa además en la poliadenilación del pre-mRNA (Kessler et al., 1997; Minvielle-Sebastia et al., 1998) y que también es metilada por Hmt1p (Shen et al., 1998; Valentini et al., 1999), Nab2p (Green et al., 2002), que también es metilada por Hmt1p (Green et al., 2002), Yra1p e Yra2p (Zenklusen et al., 2001).

Por último, y como se ha indicado anteriormente, el proceso de transporte núcleo-citoplásmico del mRNA se encuentra íntimamente acoplado a los procesos de capping, splicing y poliadenilación del mRNA inmaduro (Kessler, 1997; Zhou et al., 2000; Brodsky & Silver, 2000; Cullen, 2000; Hector et al., 2002; Reed & Hurt, 2002). En este sentido resulta interesante remarcar el que se haya encontrado que Npl3p es un componente del U1 snRNP, mostrando una asociación moderadamente específica y sensible a baja sal con el U1 snRNA (Gottschalk et al., 1998). Además, el transporte del mRNA se encuentra también acoplado a la transcripción, merced a la interacción entre ciertas proteínas de transporte del mRNA y factores de elongación de la transcripción (Sträßer et al., 2002).

1.6.4 TRADUCCIÓN

Hay un elevado número de proteínas SR que están continuamente fluyendo a través de los poros nucleares hacia el citoplasma desde el núcleo, o viceversa (Caceres et al., 1998) y promoviendo el transporte de RNA maduro hacia los ribosomas (Huang and Steitz, 2001). Aunque se creía que la función de estas proteínas terminaba en ser lanzaderas del mRNA del núcleo al citoplasma, se ha descubierto que además poseen funciones citoplasmáticas (Sanford et al., 2004). Concretamente, la proteína SR verdadera SF2/ASF de animales, se asocia a ribosomas, llegando incluso a estimular la traducción inespecíficamente, tanto “in Vivo”, como “in Vitro”. Se cree que el papel de ésta se localiza en el inicio de la transcripción, siendo este proceso aún desconocido (Sanford et al., 2004).

A todo esto hay que añadir el reciente papel que se le ha otorgado a las proteínas tipo SR en la supervivencia del mRNA (Zhang and Krainer, 2004). Concretamente y al sobreexpresar ciertas proteínas SR, se producía un descenso en los mRNAs con mutaciones sin-sentido, es decir mutaciones que provocaban una alteración en la pauta de lectura, siendo estos mRNA normalmente eliminados por la maquinaria celular (Maquat, 2004). Pero al sobreexpresar varias proteínas tipo SR, esto no ocurría, y los mRNAs sin-sentido se acumulaban en el núcleo. Esto nos indica que estas proteínas podrían también estar relacionadas con la supervivencia de todos los transcritos en general, confirmándose aún más la necesidad que tiene la célula de que estén presentes en todos los puntos en los que aparece RNA e implicando a las proteínas SR también en la degradación de RNA.

En resumen las proteínas SR intervienen en todos los procesos anteriormente nombrados, y teniendo en cuenta su función bioquímica de unión proteína-proteína, es probable que su principal función sea la de acoplar todos estos procesos, para que la ejecución de los mismos posea una mayor eficiencia estequiométrica, así como acompañar a la molécula de RNA en todo momento evitando su degradación. Por tanto, podemos concluir este apartado diciendo que las proteínas tipo SR han confirmado su participación en transcripción, splicing, transporte núcleo-citoplasmático, traducción, degradación de RNA, y sobretodo en el mecanismo de integración de todos estos procesos.

2-OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis se centra en la caracterización funcional del gen *RCY1* de *Arabidopsis thaliana*, que codifica un factor putativo de *splicing*, de la familia de proteínas "SR-like", y está aparentemente implicado en mecanismos de tolerancia a estrés salino. Para cumplir este objetivo general se han desarrollado los siguientes objetivos concretos:

- Determinación de los niveles de mRNA de *RCY1* en plantas silvestres, en ausencia y en presencia de tratamientos de estrés salino.
- Determinación de los niveles de mRNA de *RCY1* en plantas silvestres, en presencia de otros tratamientos estresantes o de fitohormonas.
- Determinación de la expresión del mRNA de *RCY1* en los distintos órganos de la planta.
- Localización subcelular de la proteína codificada por *RCY1*.
- Sobreexpresión de *RCY1* en plantas transgénicas para el estudio de la posible tolerancia a sal conferida por dicho gen. Análisis fenotípico de dichas plantas transgénicas.
- Análisis de plantas de *Arabidopsis thaliana* carentes de la expresión de *RCY1*.
- Búsqueda de la posible función de *RCY1* en condiciones normales y en los mecanismos de tolerancia a sal.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1.1 *Escherichia coli*

Todas las bacterias usadas en el presente trabajo pertenecen a la cepa DH5 α .

3.1.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

En este trabajo se han usado dos cepas de esta bacteria:

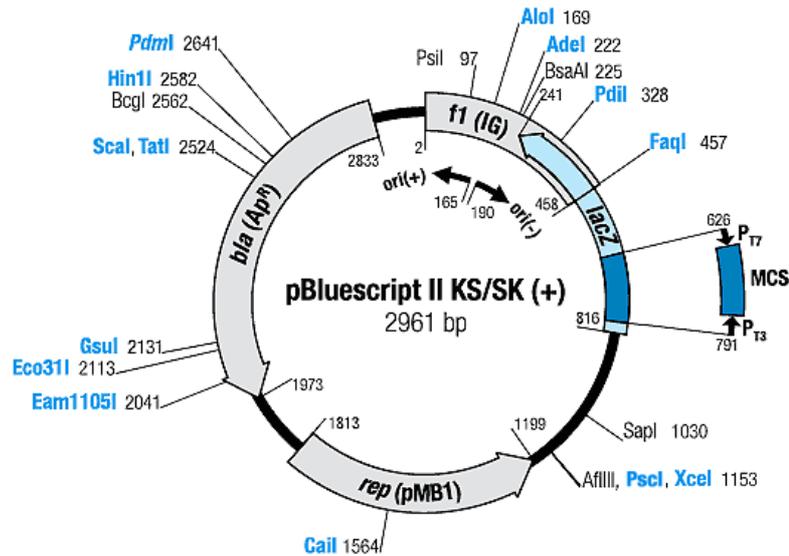
- Cepa LBA4404.pBBR1MCSvirGN54D: esta cepa hipervirulenta fue cedida por el Dr. Peter Shaw (John Innes Institute) y fue usada para la transformación de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*.
- Cepa C58C1.pGV2260: esta cepa es menos virulenta que la anterior y se usa en transformaciones por infiltración, ya que dañará menos el botón floral, permitiendo que este se recupere más rápidamente.

3.1.1.3 *Arabidopsis thaliana*

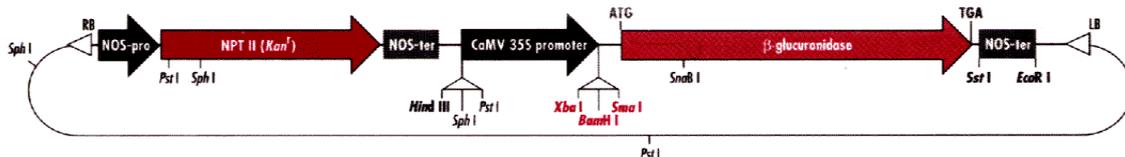
Todas las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Fam. Brassicaceae) usadas en el presente trabajo pertenecen al ecotipo Columbia-0 (Col-0) donadas por el “*Arabidopsis* stock centre” (Universidad de Nottingham, Reino Unido).

3.1.2 VECTORES

- **pBLUESCRIPT II KS + (Stratagen):** Como antibiótico de selección para este plásmido se usa la ampicilina y para la comprobación de la existencia de inserto se usa el sistema de complementación α de la β -galactosidasa.



- **pBI121 (CLONTECH):** vector usado para introducir fragmentos de DNA en planta usando *Agrobacterium* como mediador. En el caso concreto de este trabajo, se usó por poseer el gen GUS controlado por el promotor 35S. Este vector también tiene como región importante el gen *NPT-II*, que otorga resistencia a Kanamicina.



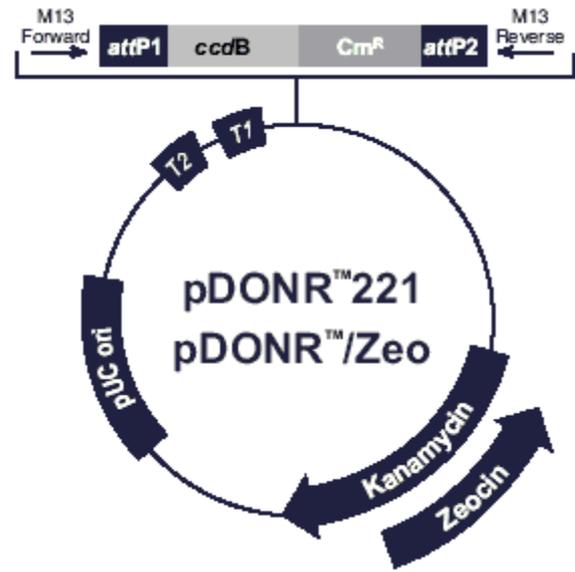
pBI121

Sma I
TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamHI

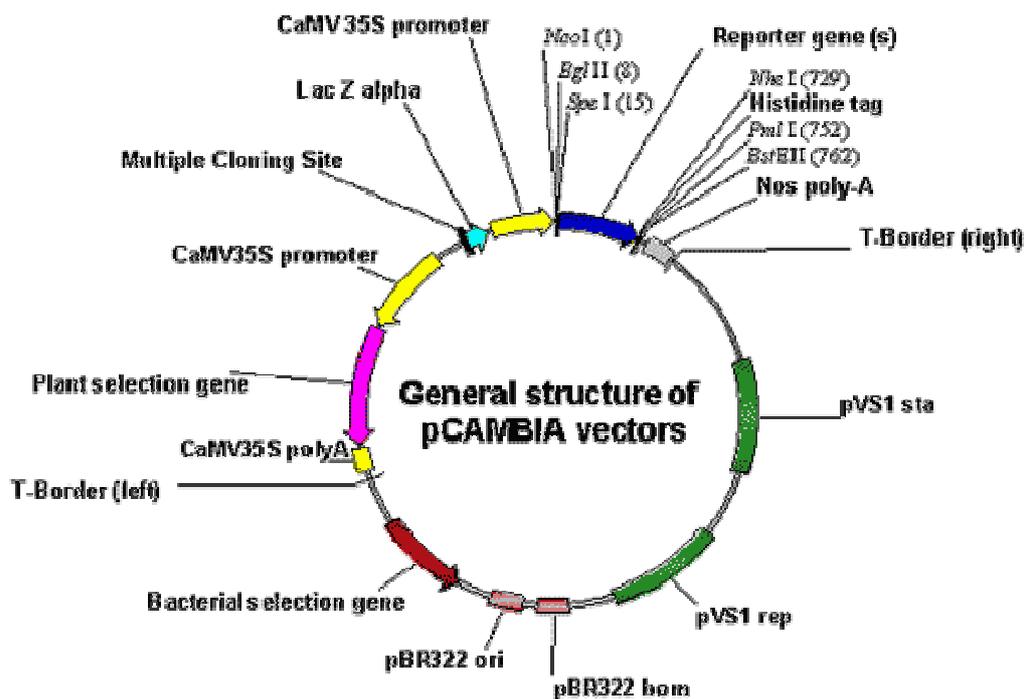
from Clontech
catalogue 1996 / 97

- **pDONR207 (INVITROGEN):** Es un plásmido para uso exclusivo del método de clonación GATEWAY. Este plásmido permite la clonación de fragmentos de DNA sin necesidad de enzimas de restricción, gracias a las secuencias attP1 y attP2 que permiten la

recombinación homóloga. Así, este vector se usará como inicio del sistema, es decir, primero se introduce el inserto en este vector que sirve exclusivamente para la replicación en *Escherichia coli*. Posee dos antibióticos de selección, el cloramfenicol y la kanamicina.



- **pGFP:** es una derivación del vector binario pCambia 302 (Curtis and Grossniklaus, 2003), donada por el Dr. Peter Shaw. Este plásmido posee el promotor 35S y en el como modificación se han introducido los sitios attL1 y attL2 para la recombinación homóloga. Posee como gen testigo el GFP, y como marcador de resistencia el gen NPT II que otorga tolerancia a kanamicina.



3.1.3 OLIGONUCLEÓTIDOS

Todos los oligonucleótidos diseñados para ser usados como cebadores en las reacciones de PCR y RT-PCR, han sido sintetizados por la compañía ISOGEN.

A continuación se muestra una relación de la secuencia de los cebadores que aparecen citados en el presente trabajo, así como donde anillan.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Explicación de la amplificación
RS-F1	TGCCTACGACGGTCTTTC	Amplifica el fragmento que codifica para el dominio RS en sentido directo.
RS-R1	AGGCGAGGCTGTTGATAC	Amplifica el fragmento que codifica para el dominio RS en sentido reverso.
CYC-F1	GAGAATTCCCGGATCTGC	Amplifica el fragmento que codifica para el dominio ciclina en sentido directo.
CYC-R1	CTATCCGACGAGCAGTAC	Amplifica el fragmento que codifica para el dominio ciclina en sentido reverso.
CYC-R2	TTGCAAGAAGTCTTTGGC	Alternativa de amplificación del fragmento que codifica para el dominio ciclina en sentido reverso.
PromRCY1-F1	CAGTGTCGACAGGTACCCATAAAAGGCC	Amplifica 1000 pares de bases de la región promotora de <i>RCY1</i> en sentido directo. Posee la secuencia de restricción para NcoI.

PromRCY1-R1	CAGTCCATGGGGAATTGGGAGATAGACG	Amplifica 1000 pares de bases de la región promotora de RCY1 en sentido reverso. Posee la secuencia de restricción para SalI.
GATRCY1-F1	AAAAAGCAGGCTCGATGATTTACTGC	Amplifica el c-DNA de <i>RCY1</i> en sentido directo. Posee los lugares de recombinación homóloga AttB1.
GATRCY1-R1	AGAAAGCTGGGTGATGGTGCCTACGACGG	Amplifica el c-DNA de <i>RCY1</i> en sentido directo. Posee los lugares de recombinación homóloga AttB2.
GATCYC-F1	AAAAAGCAGGCTCGATGATTTACTGC	Amplifica la región codificante para el dominio ciclina de <i>RCY1</i> , en sentido directo. Posee los lugares de recombinación homóloga AttB1.
GATCYC-R1	AGAAAGCTGGGTGAGTGGTACTTGA	Amplifica la región codificante para el dominio ciclina de <i>RCY1</i> , en sentido reverso. Posee los lugares de recombinación homóloga AttB2.

GATRS-F1	AAAAAGCAGGCTATGCCTGAGAATCCG	Amplifica la región codificante para el dominio RS de <i>RCY1</i> , en sentido directo. Posee los lugares de recombinación homóloga AttB1 y un triplete ATG para el inicio de la traducción.
GATRS-R1	AGAAAGCTGGGTGATGGTGCCTACGACGG	Amplifica la región codificante para el dominio RS de <i>RCY1</i> , en sentido reverso. Posee los lugares de recombinación homóloga AttB2
ACT2-F1	GTGGATCCTATGGCTGAGGCTGATG	Amplifica el gen de la <i>Actina 2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> en sentido directo. Posee el lugar de restricción BamH1.
ACT2-R1	TGGAGCTCATTAGAAACATTTTCTG	Amplifica el gen de la <i>Actina 2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> en sentido reverso. Posee el lugar de restricción Sac1.
AttB1	GGGGACAAGTTTGAAAAAAGCAGGCTNN	Contiene el lugar de recombinación homóloga AttB, utilizado en el método de clonación GATEWAY.
AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTN	Contiene el lugar de recombinación homóloga AttB, utilizado en el método de clonación GATEWAY.

3.2 TÉCNICAS DE CULTIVO

3.2.1 *Escherichia coli*

Salvo que se indique lo contrario, todas las bacterias fueron crecidas en medio LB compuesto por 1 % (p/v) triptona, 0.5 % (p/v) extracto de levadura y 1 % (p/v) de NaCl y 1 % agar-agar (en caso de cultivo en placa); todo ello ajustado a pH 7.0 con NaOH y esterilizado en autoclave (20 minutos a 120°C). La temperatura de crecimiento óptimo es de 37°C.

Los antibióticos añadidos para la posterior selección se esterilizaron por filtración, usando membranas Millex-GV (MILLIPORE) de 0'22µm de tamaño de poro. La concentración final añadida era de 100 µg/mL de cada antibiótico.

3.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Salvo que se indique lo contrario, todas las bacterias se crecieron en medio L conteniendo 1 % (p/v) triptona, 0.5 % (p/v) extracto de levadura, 0'1 % glucosa, 1 % agarosa (solo en caso de cultivo en placa) y 0'5 % (p/v) de NaCl; todo ello ajustado a pH 7.0 con NaOH y esterilizado en autoclave (20 minutos a 120°C). La temperatura óptima de crecimiento es de 25-28°C.

La adición de antibióticos se realizó de la misma forma que en el apartado anterior.

3.2.3 *Arabidopsis thaliana*

3.2.3.1 Cultivo “in Vitro” de células en suspensión

En un matraz de 500ml se mantiene una suspensión de 310ml de células, establecida en el John Innes Institute a partir de protoplastos foliares, crecidas en medio MS (Murashige and Skoog, 1962), en oscuridad y a 28°C. Cada 7 días, 10ml de este cultivo se inoculan a

300ml de MS fresco. Las células serán transformadas pasados 5-7 días después de una inoculación.

3.2.3.2 Germinación “in Vitro” de semillas

- Esterilizado de semillas: Se introducen las semillas en un tubo con etanol 70% y 0'01% Tritón X-100, y se agita durante 5 minutos en un vórtex a máxima velocidad. Pasado este período se retira la solución de etanol y se añade lejía común al 30% con Tritón X-100 al 0'01%, agitándose al vórtex durante 5 minutos.

Para finalizar se realizan de 5 a 10 lavados con agua estéril hasta que desaparezcan las burbujas. Antes de sembrar las semillas en cualquier medio, se incuban a 4°C durante 48 horas mínimo para sincronizar la germinación.

- Líquido: una vez esterilizadas las semillas, éstas se incuban durante al menos 48 horas a 4°C. Posteriormente se inoculan en 250ml de medio MS contenidos en un matraz, todo en condiciones estériles, y se incuba a 23°C, con día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) y en agitación. Si se deseaba un mayor crecimiento de las raíces con respecto a las zonas aéreas, el medio usado era ½ MS.

- En placa: las placas se componen de medio MS, agarosa al 1% y los antibióticos de selección apropiados, hasta una concentración final de 100µg/ml.

3.2.3.3 Cultivo en maceta:

Todas las macetas se componían de turba y vermiculita en proporción 1:1. Las condiciones de cultivo eran de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad), 22°C y 50% de humedad relativa.

La composición de la solución nutritiva era de macronutrientes (5 mM KNO₃, 2.5 mM K₃PO₄, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 0.036 % w/v EDTA-FeSO₄) y micronutrientes (70 µM H₃BO₃, 14 µM MnCl₂, 0.5 µM CuSO₄, 1 µM ZnSO₄, 0.2 µM Na₂MoO₄, 10 µM NaCl, 0.01 µM CoCl₂).

3.3 TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN

3.3.1 *Escherichia coli*

- **Preparación de células competentes:** se inocula 250ml de Medio A (Bacto-triptona 5g/l, extracto de levadura 1'25g/l, 10mM NaCl, 2'5mM KCl, 10mM MgCl₂ y 10mM MgSO₄) con *E. coli*, proveniente de una colonia, y se incuba mínimo 8 horas a 37°C hasta que la densidad óptica a 600nm sea de 0'6 unidades de absorbancia con respecto a agua destilada. Justo en este momento se incuba en hielo 10 minutos y se centrifuga 10 minutos más a 2500g (4°C). El pellet obtenido se resuspende en 80ml de medio TB (10mM PIPES, 55mM MnCl₂, 15mM CaCl₂ y 250mM KCl) y se incuba 10 minutos en hielo para después volver a centrifugar 10 minutos a 2500g y 4°C. El pellet se vuelve a resuspender en medio TB, pero esta vez en 20ml. Después se añaden 1'4 ml de dimetil sulfóxido puro y se incuba durante 10 minutos en hielo. Finalmente se hacen alícuotas, se congela en nitrógeno líquido y se almacena a -80°C.

- **Transformación:** se descongelan las alícuotas de células competentes lentamente en hielo y se añade el DNA en un máximo del 10% del volumen de las células. Se incuba en hielo 30 minutos, se da un choque térmico de 42°C durante 30 segundos y se deja en hielo 5 minutos más. Por último se añaden 800µl de medio LB (sin antibiótico) y se incuba durante 1 hora en agitación para después plaquear.

3.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

- **Preparación de células electrocompetentes:** se inocula una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* en 10ml de medio L conteniendo rifampicina 20µg/ml y cloramfenicol 75 µg/ml, y se incuba 16-24 horas a 28°C en agitación. Posteriormente se inoculan 500µl de este cultivo en 500ml de medio L y se incuba a 28°C en agitación, hasta que la densidad óptica a 600nm sea 0'6 unidades de absorbancia con respecto al agua destilada. El siguiente paso consiste en centrifugar a 2500g durante 10 minutos y a 4°C, para después resuspender el pellet en 500ml de agua bidestilada y estéril a 4°C. Este proceso se

repite 5 veces más hasta que se resuspende el pellet en 5ml de solución al 80% de glicerol. Se hacen alícuotas que se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a -80°C.

- **Transformación por electroporación:** se introducen 1-5µl (50-200ng) de DNA junto con 40µl de células electrocompetentes en una cubeta de electroporación (previamente enfriada hasta 4°C) de 0'2cm de amplitud. Una vez tapada la cubeta, se le aplica un pulso de corriente con los parámetros 400Ohms, 25µFD y 2'5kV en un electroporador BIORAD. Inmediatamente después se añade 0'8ml de medio SOC (2% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 25mM KCl, 50mM MgCl₂, 20mM glucosa), se traspasa a un tubo Eppendorf y se incuba a 28°C durante 4 horas. El último paso es sembrar en placas Petri con medio L que contiene rifampicina 20µg/ml, cloramfenicol 75µg/ml y el antibiótico de selección. Una de las colonias crecientes se crece en medio L con los antibióticos durante 24 horas a 28°C. Después se centrifuga a 2500g y 4°C durante 15 minutos y se resuspenden las células en tampón de infiltración (10mM MgCl₂, 5% sacarosa, 0'02% (v/v) Silwet L-77, MES pH 7 1g/l y citoquinina MAP 44nM) o en medio L. Con la solución de infiltración se transformarán plantas adultas, pero para transformar células en suspensión sólo se necesitará que las células estén en medio L.

3.3.3 *Arabidopsis thaliana*

3.3.3.1 Células en suspensión

Una alícuota de células de *Agrobacterium tumefaciens*, previamente transformadas, se añade a un cultivo concentrado de células de *Arabidopsis thaliana* en suspensión. Se incuba durante mínimo 3 días a 28°C y en oscuridad. El resultado es que en un mínimo del 10% del conjunto de células, se ha producido la transformación, siendo éstas susceptibles de selección.

3.3.3.2 Plantas adultas

- **Preparación de las plantas a transformar:** se crecen plantas en maceta hasta que el tallo floral alcance aproximadamente los 5cm, momento en el que se poda la inflorescencia primaria para estimular la aparición de secundarias. Cuando se observe un número elevado de flores, habiendo aún primordios florales, se seleccionan estas macetas y se las somete a los siguientes pasos:

- **Infiltración “in planta”**: se sigue el protocolo descrito por Bechtold y Pelletier en 1998. Éste es un método de transformación “in vivo”, es decir, no requiere pasos previos de desdiferenciación y regeneración que causan numerosas mutaciones. El método consiste en sumergir los tallos florales de la planta en la solución de las células de *Agrobacterium tumefaciens* y el tampón de infiltración, sometiendo el conjunto al vacío durante 10 minutos.

Una vez finaliza la infiltración, se introducen las macetas en bolsas de plástico y se mantienen durante 48 horas mínimo, para así evitar la pérdida de humedad y favorecer la recuperación.

- **Obtención de plantas homocigotas para el gen introducido**: una vez transcurrido el tiempo de fructificación y de secado de las semillas, éstas se siembran en placas con medio MS, agarosa 1% y kanamicina 100µg/ml, para seleccionar las transformantes. Las semillas transformadas podrán germinar en este medio con el antibiótico. Después, las semillas que han germinado se dejarán crecer hasta la fructificación, momento en el que se recogerán las semillas de cada planta por separado. Posteriormente estas semillas provenientes de una única planta, se sembrarán de nuevo en placa con el antibiótico, contándose esta vez el número de semillas que germinan. Si esta segregación se corresponde con la mendeliana se realizará lo mismo con cada planta de la placa, y si en la 4ª generación se sigue cumpliendo la segregación esperada, las líneas serán calificadas como homocigotas y con sólo una copia del gen.

3.4 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.4.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.4.1.1 Extracción de DNA

- Plasmídico de *Escherichia coli*

Dependiendo de la cantidad de DNA que deseamos, obtener podemos usar uno de los siguientes métodos:

- “Minipreparaciones por hervido”:

Se usa con poco volumen de cultivo bacteriano, máximo 1’5 ml, por lo que se obtendrá menos cantidad de plásmido.

Previamente se crece un cultivo de la bacteria durante mínimo doce horas en medio LB (10 g/l Bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl) con el antibiótico deseado y a 37 °C. Pasado el tiempo indicado se transfiere un máximo de 1'5 ml a un Eppendorf, centrifugándose a 10000 g durante 30 segundos y a 4°C. El pellet obtenido se resuspende en el tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7'5, 62'5 mM EDTA, 0'4% Tritón X 100 y 2'5 M LiCl), se incuba en hielo 5 minutos y se añade lisozima 1 mg/ml. Tras 3 minutos de incubación se hierve a 98 °C durante 1 minuto, se coloca en hielo otros 5 minutos y se centrifuga a temperatura ambiente durante 30 minutos más. Se retira el pellet con un palillo, dejando sólo el sobrenadante, para posteriormente añadir 2 volúmenes de Etanol absoluto e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Por último se centrifuga el tubo a 10000 g durante 15 minutos, se lava el pellet con Etanol 70%, se seca y se disuelve el pellet en agua.

- “Maxipreparaciones”:

Se crece un medio igual al apartado anterior pero en este caso se centrifuga la totalidad del cultivo (50 ml) a 6000g durante 15 minutos y en frío. El pellet resultante se resuspende en tampón S1 (50 mM Tris-HCl pH 7, 10 mM EDTA y 100 µg/µl de RNAsa A). Ahora se añade el mismo volumen de tampón S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y se mezcla por inversión 8 veces para después incubar 3 minutos a temperatura ambiente. Después se añade el mismo volumen de tampón S3 (2'8 M Acetato de potasio pH 5'1) y se mezcla igual que el paso anterior, dejándolo incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Se formará rápidamente un precipitado floculento que se eliminará centrifugando a 12000 g durante 40 minutos. El sobrenadante resultante se pasa por una columna NucleoBond AX 500 (Clontech), previamente calibrada con tampón N2 (100 mM Tris-HCl pH 6'3, 900mM KCl y etanol 15%) y se lava la columna 2 veces con un volumen igual al obtenido de tampón N3 (100 mM Tris-HCl pH 7, etanol al 15% y 1'15 M de KCl). El DNA plasmídico queda retenido en la columna y se eluye con tampón N5 (100mM Tris-HCl pH 8'5, 15% de Etanol y 1 M de KCl). Al volumen resultante se añade ¾ de isopropanol que precipita el plásmido, y se centrifuga a alta velocidad (más de 15000 g) durante 30 minutos a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y el pellet resultante se lava con etanol al 70%, se seca y se disuelve en la cantidad de agua apropiada.

- **Genómico de Plantas**

Se trituran 2gr de material vegetal en un mortero común con la ayuda de nitrógeno líquido. El polvo resultante se introduce en un tubo Eppendorf y se incuba 10 minutos a -20°C con tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0.5% (p/v) de SDS) y Acetato de sodio pH 5.2 1 M. A continuación se centrifuga a 10000 g durante 15 minutos en frío. El sobrenadante resultante se transfiere a otro tubo similar para precipitar con un volumen de isopropanol, 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga 15 minutos a 10000 g y se elimina el sobrenadante, lavando el pellet con etanol 70%. Para finalizar, secamos el tubo y disolvemos el pellet en agua bidestilada.

3.4.1.2 Extracción de RNA de plantas.

Este método se basa en el compuesto TRIZOL (INVITROGEN) y el protocolo es el propuesto por el fabricante con modificaciones.

Para comenzar se tritura el tejido vegetal elegido, previamente congelado con nitrógeno líquido para evitar cualquier reacción biológica, en un mortero común. Aproximadamente 100mg de material triturado se transfieren a un tubo eppendorf, añadiéndose 1 ml de TRIZOL y se dejan incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añade 1/5 del volumen total de Cloroformo, se agita 15 s al vórtex, se deja reposar 2 minutos y finalmente se centrifuga en frío 15 minutos a 12000 g. De las dos fases resultantes se transfiere la superior (fase acuosa) a otro tubo, donde se añadirá el mismo volumen de alcohol isopropílico para precipitar el RNA. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y después se centrifuga en frío a 12000 g durante 10 minutos. Posteriormente se elimina el sobrenadante y se lava el pellet con etanol al 70%, centrifugándose después a 7500 g en frío durante 5 minutos. Finalmente se elimina el etanol y se seca el pellet en una bomba de vacío, para después poder disolverlo en agua bidestilada.

3.4.2 GELES DE AGAROSA

3.4.2.1 Preparaciones para DNA

Salvo que se indique lo contrario, todos los geles realizados se componían de agarosa D-1 (PRONADISA) diluida en tampón TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 2 mM EDTA) para geles preparativos y TBE (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) para geles analíticos. La concentración final de agarosa en ambos fue del 0'7-1'5%, añadiéndose también bromuro de etidio a una concentración 0'5µg/ml, para poder visualizar las bandas de DNA. Las muestras se cargaban en el gel utilizando tampón de carga 6x [60mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0,03 azul de bromofenol, 60% glicerol] para facilitar la dispensación y evitar la difusión de la muestra, así como visualizar el frente. El potencial eléctrico aplicado posteriormente, oscilaba entre 60-100 V, usándose el mismo tampón TAE o TBE en la cubeta de electroforesis.

Para observar las bandas que se han desplazado en el gel, se usa un transiluminador siendo la longitud de onda aplicada de 254nm para geles analíticos, y 366nm para los geles preparativos, intentando así minimizar el daño a los ácidos nucleicos en el último caso, ya que de ellos se aislarán fragmentos de DNA.

3.4.2.2 Preparaciones para RNA

En este caso se preparaban geles conteniendo agarosa D-1 (PRONADISA) al 1'9 % (p/v) disuelta en MOPS (0.2 M de concentración final) y formaldehído (concentración final de éste 9% v/v), que desnaturaliza el RNA. A continuación se deja secar en el molde apropiado y siempre en campana extractora debido a la neurotoxicidad del formaldehído.

La carga de las muestras en el gel se realizaba con un máximo 40 µg RNA y conteniendo MOPS 20 mM, formaldehído 17'5% (v/v), formamida 50% (v/v) y bromuro de etidio 0'075 µg/ml (la cantidad de este compuesto es tan pequeña porque se intenta evitar que este interfiera en la posterior hibridación para el Northern blot, por tanto la visualización será débil).

Por último, el tampón usado en la cubeta era MOPS 0'4 M y el potencial eléctrico aplicado era de 50 V, menor que el aplicado a geles de DNA. Así, al ser el gel de mayor tamaño y el voltaje menor, la separación entre bandas de tamaño similar tendrá mayor resolución.

Hay que indicar que todos los reactivos se diluyeron en agua tratada con DEPC para evitar la acción de las RNAsas.

3.4.3 AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA

Se usa el “kit de aislamiento de DNA de Millipore”, pero con modificaciones.

Una vez corrido el gel preparativo (ver apartado 3.4.2.1) y cortada la banda a purificar, se introduce ésta en un cartucho del “kit” y se centrifuga a 12000 g durante 20 minutos. Si al volumen obtenido lo llamamos v_1 , introducimos ahora $400\mu\text{l}-v_1$ al cartucho, dejando incubar 1 hora. Después se procede a otro centrifugado igual. El volumen obtenido se mezcla con 2 μg de t-RNA y el mismo volumen de PCI. Pasados 5 minutos se recupera la fase acuosa y se precipita el DNA con etanol absoluto y acetato de sodio 150mM, dejando incubar la mezcla 2 horas a -20°C .

Finalmente, la mezcla se centrifuga a 12500g durante 30 minutos, se lava el pellet obtenido con etanol 70%, se seca y se redisuelve el DNA en agua.

3.4.4 AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR

Todas las reacciones de polimerización, salvo las utilizadas para el método de clonaje GATEWAY (Ver apartado 3.5.1), se realizaron en un volumen final de 50 μl , conteniendo 0.5 μg de los dos cebadores, 0.2 mM de los 4 desoxirribonucleósidos 5' trifosfato, tampón de polimerización de ROCHE al 10% (v/v), y 3 unidades de la enzima termoestable *TaqDNA polymerase* (ROCHE).

Posteriormente, la reacción se llevaba a cabo en un termociclador tipo Mastercycler 5330 (Eppendorf), durante un determinado número de ciclos (dependiendo del experimento) compuestos por los siguientes pasos:

- 95 °C durante 1 minuto para separar las 2 hebras de ADN.
- 44-56 °C (dependiendo de la longitud y composición de los cebadores) durante 30 segundos. Ésta es la llamada temperatura de anillamiento, en la que los cebadores se unen específicamente a su secuencia homóloga. A mayor temperatura, mayor especificidad deberá haber entre los cebadores y su secuencia homóloga.
- 72 °C durante 1 minuto por cada 1000 pares de bases de ADN. A esta temperatura tiene su máxima velocidad la Taq polimerasa.

3.4.5 CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se diluye la muestra problema en agua (proporción 1:1000) y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 260nm (λ_1) y 280nm (λ_2). Si la división λ_1/ λ_2 es aproximadamente 2, no hay contaminación por otras sustancias biológicas, principalmente proteínas. La concentración la obtenemos de las fórmulas:

$$\text{Concentración RNA } (\mu\text{g}/ \mu\text{l}) = \text{Absorbancia } \lambda_1 \times 40$$

$$\text{Concentración DNA } (\mu\text{g}/ \mu\text{l}) = \text{Absorbancia } \lambda_1 \times 50$$

3.4.6 MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se usan estas sondas para detectar ácidos nucleicos fijados en membrana. Si el ácido fijado en membrana es RNA, con las sondas de RNA antisentido obtendremos mayor poder de detección, a menor concentración de muestra fijada en membrana, necesitaremos menos sonda para poder observarlo. Esto es debido a dos factores, en primer lugar que los híbridos RNA-RNA son más fuertes que los DNA-RNA, y en segundo, al utilizar una sonda de RNA esta hibrida con el RNA de la membrana sin tener que competir con la otra hebra complementaria, ya que esta es monocatenaria.

3.4.6.1 Sondas de DNA

En este caso se utilizó una reacción de PCR (Ver apartado 3.4.4), añadiendo aproximadamente 2000kBq de [α - ^{32}P] dCTP a la reacción. Para esto se debe disminuir un 20% la concentración de dCTP no radiactivo.

La posterior purificación se realizó con columnas cromatográficas Real Spin G-50 (REAL), siguiendo el protocolo aconsejado por el fabricante. Este protocolo consiste en resuspender la resina de la columna al vórtex y luego centrifugar para eliminar el tampón de equilibrio. Posteriormente se coloca la muestra en la resina y se centrifuga a 750g durante

dos minutos. El resultado es que los nucleótidos marcados que no han sido incluidos en la sonda quedan retenidos y se usa el líquido eluido que es el que contiene la sonda.

3.4.6.2 Sondas RNA

Este proceso se basa en la transcripción “in Vitro”, es decir la síntesis de una cadena de RNA a partir de un DNA molde.

Todo empieza a partir de un plásmido (en este caso el pBluescript) que contenga el inserto deseado junto a los promotores T3 o T7 de los fagos, reconocidos por la RNA polimerasa del fago correspondiente. Este plásmido se utilizará de molde para la cadena de RNA a sintetizar, que tendrá que ser la cadena antisentido del RNA hibridado en membrana a detectar.

Así, se selecciona el sentido correcto en cada caso y se procede a la linealización del plásmido por restricción. Después, se comienza la reacción de transcripción, mezclando los siguientes reactivos: plásmido 25-50ng/μl, 0’5mM de ATP, GTP, UTP, 0’4mM de CTP, 0’1mM de [α -³²P]CTP (aproximadamente 2000 kBq), 1x tampón de transcripción (ROCHE) y 0’5U/μl de RNA polimerasa T7 o T3 según el sentido a transcribir. Después de incubar 2 horas a 37°C se añade 1U/μl de DNAsa (ROCHE) libre de RNAsa, incubándose durante 20min a temperatura ambiente para eliminar posibles restos de DNA que podrían interferir en posteriores reacciones. El resultado de este último paso podrá utilizarse directamente para hibridar con la membrana deseada.

3.5 CLONACIÓN DE DNA.

3.5.1 MÉTODO DE CLONACIÓN “GATEWAY”.

Este es un método de clonación basado en la recombinación homóloga de fragmentos de DNA.

Se sigue el protocolo recomendado por el fabricante www.invitrogen.com.

Para comenzar se deben diseñar unos cebadores para amplificar el fragmento a clonar, pero deben poseer también las siguientes secuencias:

- Cebador-F: AAAAAGCAGGCT seguido de 12 a 15 pares de bases del fragmento a clonar, comenzando por el triplete ATG (inicio de la traducción).
- Cebador-R: AGAAAGCTGGGT seguido de 12 a 15 pares de bases antisentido del fragmento a clonar, comenzando por el codón de fin de la traducción, pero cambiando una de las bases por otra distinta, con la finalidad de eliminarlo y así poder agregar más fragmentos de DNA y que éstos puedan transcribirse.

A continuación se utilizan estos cebadores para una reacción de PCR (Ver apartado 3.4.4), pero modificando la enzima usada Pfx (ROCHE), porque es una enzima que introduce una cantidad menor de mutaciones, y la duración de los ciclos (10 en total):

- 94°C durante 15 segundos.
- 55°C durante 30 segundos.
- 68°C 1min/Kb

Posteriormente, 10µl de esta reacción son usados para realizar otra PCR utilizando la misma enzima, los cebadores AttB1 y AttB2, y durante 5 ciclos, compuestos por:

- 94°C durante 15 segundos.
- 45°C durante 30 segundos.
- 68°C 1min/Kb.

En este paso se añade el resto de la secuencia homóloga de recombinación, ya que los cebadores usados poseen una zona de coincidencia con los cebadores de la primera reacción y otra que en la reacción de PCR no complementa con nada, pero si es complementaria de la secuencia de recombinación.

La totalidad de esta reacción es usada para otra PCR, siendo solo necesario cambiar el número de los ciclos, 20 en total, y su composición:

- 94°C durante 15 segundos.
- 55°C durante 30 segundos.
- 68°C 1min/Kb.

Al finalizar este paso ya tendremos el fragmento deseado, flanqueado por las secuencias de recombinación homóloga.

Por tanto para que tengamos el fragmento de DNA en el vector escogido, resta realizar la reacción de recombinación. Para ello se mezclan 400ng del producto de esta última PCR, 100ng del plásmido pDONR, 0'5U/µl de Clonasa BP (ROCHE) y tampón de Clonasa BP (ROCHE) 1x, completando con agua hasta 6'67 µl. Una vez incubado toda la

noche a temperatura ambiente, se procederá a la transformación de *Escherichia coli* (Ver apartado 3.3.1), seleccionando las cepas transformantes con kanamicina, gentamicina y cloramfenicol.

Este plásmido será usado como vector “madre” para las siguientes reacciones de recombinación, en la que añadiremos otros fragmentos de DNA al ya clonado.

La reacción posterior con otros plásmidos con sitios de recombinación ATT se realizará con otra enzima, la Clonasa LR (ROCHE) y mezclando la misma cantidad del pDONR y el plásmido escogido, junto con 0’5U/μl de la enzima LR, 0’25U/μl de Topoisomerasa 1(ROCHE) y el tampón para la Clonasa LR (ROCHE) 1x.

3.5.2 CLONACIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

En primer lugar, debemos aislar el fragmento de DNA a clonar, y linealizar el plásmido donde será introducido. Para esto realizaremos una reacción de PCR (Ver apartado 3.4.4) del DNA a clonar, para así asegurarnos de tener la suficiente cantidad de éste, porque es conveniente que se esté en exceso con respecto al vector de origen. A la secuencia de los cebadores utilizados en cada caso se le añade una secuencia diana de una enzima de restricción, que favorecerá los pasos posteriores.

A continuación se linealiza el plásmido a partir de una Mini-preparación. Para esto se incuba 50-500μg del plásmido entero, 1U/μl de RNAsa, 1μg/μl de BSA, enzima de restricción seleccionada 0’5U/μl junto con el tampón de ésta 1x. Transcurridas 2 horas a 37°C se parará la reacción congelando a -20°C.

El siguiente paso es correr un gel preparativo (Ver apartado 3.4.2.1) con el producto de PCR y el de la restricción, para después poder aislar los fragmentos correctos siguiendo el protocolo de aislamiento de fragmentos de DNA de geles (Ver apartado 3.4.3).

Una vez aislados los 2 fragmentos, se procederá a su ligación. Hay que tener en cuenta que en los cebadores de la PCR se introdujo la secuencia reconocida por la restrictasa para que así la ligación se realice en el sentido adecuado. La reacción de ligación consiste en mezclar 1U/μl de T4 DNA ligasa (ROCHE), tampón de ligación (ROCHE) 1x y los dos productos aislados del gel en proporción molar 1:5 (vector/inserto). Una vez incubado 14 horas a 4°C, se transforma *Escherichia coli* (Ver apartado 3.3.1) y se seleccionan las colonias resistentes al antibiótico (cuya resistencia es otorgada por el plásmido) y de color blanco (sistema de complementación α de la β-galactosidasa).

3.6 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.6.1 NORTHERN BLOT

Una vez aplicada la corriente eléctrica a un gel para preparaciones de RNA (Ver apartado 3.4.2.2), previamente cargado con el RNA de las muestras a estudiar extraídas por el método del TRIZOL (Ver apartado 3.4.1.2), se procede a la transferencia de éstos ácidos nucleicos a una membrana de nylon Hybond N+ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH), sobre la cual se producirá la hibridación con la sonda radiactiva. Para esto se realizó una transferencia por capilaridad, consistente en la colocación del gel contiguo a la membrana, y bajo ésta, una serie de 3 capas de papel de filtro tipo “Gel-blotting” (SCHLEICHER&SCHULER) y 20 capas de papel de filtro convencional. Sobre el gel se coloca un papel de filtro puente que estaba bañado por los extremos con SSC 10x (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato sódico, ajustado a pH 7 con HCl). Así el agua con el tampón viaja por capilaridad del papel de filtro puente al gel, y arrastra con él a los ácidos ribonucleicos hacia la membrana, donde quedan retenidos. Este montaje se deja un mínimo de 12 horas.

Posteriormente se separan membrana y gel, y se comprueba que la transferencia se ha realizado, visualizando ésta en un transiluminador con luz a 366nm.

Para fijar el RNA a la membrana y que éste no se desprenda en los pasos posteriores, se ilumina ésta a 264nm en el mismo transiluminador durante 30 segundos y se seca.

Una vez finalizado el proceso de secado, se introduce la membrana en un tubo de cristal junto con solución de hibridación (SSC 5x, 0'1 v/v SDS, 50% v/v formamida, 50mM fosfato sódico pH 6'8, 0'1% p/v pirofosfato de sodio y 50µg/ml de DNA de esperma de *Salmo salmo* y se deja prehibridar a 42°C durante un mínimo de dos horas. Transcurrido este tiempo se añade la misma solución pero conteniendo la sonda ya marcada (Ver apartado 3.4.6) y se deja hibridar a 42°C mínimo 12 horas.

El siguiente paso es lavar la sonda que ha hibridado inespecíficamente. Para ello se realizan los siguientes pasos:

- 10 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC y 0'1% SDS.
- 10 minutos a 37°C con 0'1x SSC y 0'1% SDS.
- 15 minutos a 42°C con 0'1x SSC y 0'1% SDS.
- 10 minutos a 65°C con 0'1x SSC y 0'1% SDS.

Ahora sólo resta sellar la membrana en una bolsa de material plástico e introducirla en un “cassette” de exposición con pantalla intensificadora, junto con un film de autorradiografía. Finalmente se introduce el conjunto a -80°C y se espera al revelado que se realiza en una máquina Kodak M-35 X-OMAT.

3.6.2 RT-PCR

Este método es usado como alternativo al Northern Blot, como medio de cuantificar la expresión de un gen. Posee una mayor sensibilidad pero una menor fiabilidad, ya que incluye una amplificación por polimerasa de DNA (PCR), lo que provoca que el método sea semicuantitativo.

En el caso concreto del gen *RCY1*, se usó para ensayos a tiempos cortos y sin inducción por sal, ya que el método de cuantificación Northern no resultaba suficientemente sensible para observar expresión basal del gen *RCY1*.

Una vez congeladas en nitrógeno todas las muestras sometidas a estudio, se prosiguió a la extracción de RNA total por el método del Trizol (Ver apartado 3.4.1.2). Después se prosiguió a la cuantificación del RNA por espectrofotometría y por comparación en gel, para así poder comparar ambas y ser más precisos en la cuantificación.

Una vez conocida la concentración de cada muestra se colocaron $5\mu\text{l}$ de cada una a partir de una dilución $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, es decir, un total de $0.5\mu\text{g}$ de RNA por muestra, en tubos Eppendorf y se calentó durante 10 minutos a 65°C para desnaturalizar.

Posteriormente se añaden al mismo tubo los siguientes componentes; $2\mu\text{l}$ de desoxinucleótidos trifosfato (2mM), $2\mu\text{l}$ de ditriitol (1M), $4\mu\text{l}$ 5xRT-buffer (ROCHE), $1\mu\text{l}$ DNAsa (ROCHE) y $5\mu\text{l}$ del cebador reverso. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a 37°C para que actúe la DNAsa eliminando posibles restos contaminantes de DNA y se elimina esta enzima a 65°C durante el mismo tiempo.

A continuación se comienza la retrotranscripción añadiendo $0.5\mu\text{l}$ de inhibidor de la RNAsa ($4\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (PROMEGA) y 25 U/reacción de retrotranscriptasa (ROCHE) y, dejándose incubar 2 horas a 37°C .

Por último se realizan varias PCR con los distintos productos de la retrotranscripción, para encontrar el nº de ciclos antes de que la reacción se sature y deje de ser cuantitativa. En el caso de todas las retrotranscripciones de este trabajo se realizaron 32 ciclos.

De todas las muestras se realizó un control interno negativo, que consistía en mezclar todos los componentes excepto la retrotranscriptasa, para descartar contaminación por DNA.

3.7 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

3.7.1 INMUNOLOCALIZACIÓN

Este método de localización de proteínas consta de cinco pasos principales:

- **Preparación de los portaobjetos:** se colocan portaobjetos de 8 pocillos en un soporte, que se introduce a su vez en un recipiente con agua destilada y detergente Decon 90 al 10%. Después de mantener en agitación durante 1 hora se lava con agua bidestilada y se seca en una estufa a 50°C durante toda la noche. Al día siguiente se introduce el soporte con los portaobjetos en una mezcla de 400 ml de acetona y 8 ml de Aptes, durante 10 segundos. Después se lava con acetona y se seca al aire para posteriormente introducirlo en glutaldehído 100% durante 30 minutos en agitación. Para finalizar se lava con agua destilada y se seca en la estufa hasta la desaparición del agua.

- **Fijación del material vegetal:** se siembran semillas, previamente esterilizadas con lejía al 10%, en placas con medio MS y agarosa al 1%. Se introducen las placas en la cámara fría a 4°C durante 2 días y después se colocan a 20°C y 16 horas de luz durante otros 2 días, en posición vertical. Pasado este período las plantas están germinadas pero su raíz es lo suficientemente fina como para que se pueda observar en su interior con el microscopio óptico. Así, se comienza con la fijación al introducir las plántulas en un tubo de ensayo con 10 ml de tampón PEM (100mM PIPES-NaOH pH 6.2, 2mM EGTA, 1mM MgSO₄, 2mM DTT) y la misma cantidad de paraformaldehído(8% p/v), dejando en agitación suave durante 1 hora. A continuación se elimina el contenido líquido del tubo y se lavan las plántulas una vez con tampón PEM y 0.2% de detergente Nonidet, y dos veces más con tampón PEM únicamente. Este último paso dejará fijadas las plántulas; sólo restará colocarlas en los portaobjetos activados en el paso anterior y cortarlas con la ayuda de una cuchilla, para dejar solo 2 segmentos de raíz por pocillo. Se seca el conjunto utilizando una lámpara común.

- **Permeabilización celular:** se requiere este paso para que pueda penetrar el anticuerpo a añadir posteriormente. Para ello, se añadirá una gota con la siguiente mezcla enzimática a cada pocillo: 1% de driselasa, 0'5% de celulasa y 0'025% de pectolasa Y23 en tampón PEM. Después se aspira cada gota y se añade 5 veces tampón PEM a cada pocillo. A partir de este paso es importante que nunca se sequen las raíces.

- **Bloqueo del poro por BSA:** se añade una gota de BSA al 3% por cada pocillo, se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se aspira el BSA.

- **Adición de anticuerpos:** se inicia el proceso añadiendo una gota del anticuerpo primario (el que interacciona con la proteína buscada), diluido en BSA al 3%, y se deja actuar un mínimo de 12 horas en un recipiente que actúe de aislante lumínico y a 4°C. Pasado este período se introducen los portaobjetos en una jarra “Coplin” con tampón TBS (0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH 7.6), que eliminará cualquier resto de anticuerpo que no esté interaccionando si deja en agitación durante una hora. A continuación se elimina toda la humedad remanente del portaobjetos por aspiración y se coloca el anticuerpo secundario (será el que se una al primario y permita su detección). Pasadas 2 horas se lava otra vez en TBS y se deja una hora más. Después se añade Dapi (1µg/ml), concretamente 15 µl por pocillo. Se deja actuar 5 minutos, se elimina el Dapi por aspiración, se lava con agua y se realiza un último secado completo. El último paso es el montaje de la preparación de portaobjetos y cubreobjetos con la ayuda de líquido tipo “vector shield” para pegar ambas partes, y barniz para el sellado definitivo. El almacenaje de la preparación se realizará siempre en frío y oscuridad para preservar la fluorescencia del anticuerpo secundario, si se da el caso.

3.8 TRANSCRIPCIÓN “in Vitro”

3.8.1 AISLAMIENTO DE NÚCLEOS

Para poder realizar este proceso en primer lugar hay que hacer una preparación de protoplastos. Así, 5gr de hojas frescas de Arabidopsis, cortadas en fragmentos de 2mm, son añadidos a 20 ml de solución de digestión [0.5M Sorbitol, 10mM HEPES-KOH (pH 7.9),

1mM CaCl₂, 1.6% macerozima y 1.6% celulasa). Posteriormente se somete a la mezcla a la cámara de vacío durante 2 minutos, que permitirá entrar a la solución a los espacios intercelulares. Después se incuba 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo, se filtra la solución resultante con un filtro con tamaño de poro superior a 50µm. la parte recogida que contendrá los protoplastos es centrifugada a 4°C y 200g durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante, y los protoplastos se resuspenden en tampón de flotación [0.44M Sorbitol, 60% percoll (V/V), 10mM HEPES-KOH (pH 7.9) y 1mM CaCl₂]. Después se hacen 3 lavados seguidos con centrifugación, con medio de resuspensión [0.5M sorbitol, 10mM HEPES-KOH (pH 7.9) y 1mM CaCl₂] al que se añade respectivamente 45%, 35% y 0% de percoll respectivamente. Finalmente el volumen resultante se diluye en 10ml de medio de resuspensión, obteniéndose aproximadamente 6x10⁶ protoplastos por gramo de tejido inicial.

El siguiente paso es la extracción de núcleos propiamente dicha. Para esto se mezclan 15x10⁶ protoplastos en 15ml de tampón de aislamiento de núcleos [10mM HEPES-KOH (pH 7.9), 18% sacarosa, 1% (p/v) polivinilpirrolidona, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM DTT, 0.15mM espermina, 0.5 espermidina, 10mM NaCl, 0.15% Tritón, 3µg/ml pepstatina, 2 µg/ml leupeptina, 1mM PMSF y 1mM benzamida] y se incuba 7 minutos a 4°C. Posteriormente se filtra el volumen resultante con filtros con tamaño de poro de 5µm y se centrifuga el volumen resultante a 500rpm durante 8 minutos, eliminándose el sobrenadante. Si el pellet tiene coloración verde, hay contaminación citoplasmática, siendo conveniente repetir el proceso con menor cantidad de protoplastos inicial. El pellet se resuspende en tampón de aislamiento de núcleos sin Tritón y con 20% de glicerol.

3.8.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO NUCLEAR

En primer lugar se debe obtener un extracto de proteínas de los núcleos aislados (Fan and Sigiura, 1995). Para esto, en primer lugar se añaden 2 volúmenes de tampón de extracción nuclear [10mM HEPES-KOH (pH 7.9), 25% sacarosa, 4mM MgSO₄, 1mM EGTA, 5mM DTT, 10mM NaCl, 0.15% Tritón, 3µg/ml pepstatina, 2 µg/ml leupeptina y 1mM PMSF]. El siguiente paso necesario es lisar los núcleos para que así se liberen sus componentes. Para esto se añade sulfato de amonio 4M, hasta una cantidad final de 0.44M, una cantidad suficiente para lisar y que no precipitará las proteínas necesarias para el posterior ensayo. El lisado fue ultracentrifugado a 200000g durante 1 hora para eliminar las membranas, DNA y otros precipitados, quedando en el sobrenadante la fracción soluble de

proteínas. El sobrenadante se dializó contra 500ml de tampón de diálisis [10mM HEPES-KOH (pH 7.9), 20% glicerol, 100mM acetato potásico, 0.2mM EGTA, 0.1mM EDTA, 2mM DTT y 0.5 PMSF] para eliminar el sulfato amónico, utilizándose columnas “Slide-A-Lyzer Mini Dialysis” de Pierce durante 4 horas. El sobrenadante obtenido contendrá todas las proteínas necesarias y no poseerá DNA endógeno.

3.8.3 TRANSCRIPCIÓN “in Vitro”

El siguiente paso es la transcripción “in Vitro” propiamente dicha (Fan and Sigiura, 1995). Así, en 50µl finales se mezclan 1 pmol de DNA linealizado, conteniendo el gen testigo fusionado al promotor 35S, con 32 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 12% glicerol, 80 mM acetato potásico, 5 mM MgSO₄, 2.5 mM DTT, 0.05 mM EDTA, 0.1 mM EGTA y el inhibidor de RNAsas “RNAsin” de Promega, 1mM SAM y aproximadamente 200µg de extracto nuclear. Esta mezcla se incuba 10 minutos en hielo y se inicia el proceso de transcripción añadiendo una concentración de 12.5mM de cada NTP, se incuba 30 minutos a 28°C y se para la reacción añadiendo 20mM EDTA, 0.2M NaCl, 1% SDS, 5mg/ml glicógeno y 1µl de proteinasa K (20mg/ml), dejando incubar durante 10 minutos.

El siguiente paso es extraer el RNA al añadir 0.5M de acetato sódico a 200µl de la solución resultante, añadir 2 veces fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:isoamílico (24:1).

Por último se realiza una RT-PCR (Ver apartado 3.6.2) para comprobar los niveles de expresión.

3.9 DETECCIÓN DE GUS

Se sumergen las partes de la planta a revelar, en una solución 2mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide (X-Gluc) y tampón fosfato pH 7 durante 12 horas a 37°C. Esta sustancia es utilizada por la β-glucuronidasa para crear una sustancia azulada que servirá para localizar la expresión de esta proteína. Después se somete a las partes sumergidas a repetidos lavados de etanol al 70% (Jefferson et al., 1987), hasta que se decolora el tejido y solo queda la coloración azulada en fondo blanco.

4-RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE RCY1

Se procedió a realizar un análisis del gen *RCY1* a nivel bioinformático. Así, se utilizaron todo tipo de programas y técnicas informáticas, que nos ayudarán a predecir el posterior comportamiento de este gen, y a explicar algunos de sus mecanismos de acción.

4.1.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

Utilizando la base de datos del proyecto TAIR (The Arabidopsis Information Resource localizada en www.arabidopsis.org), se localizó la secuencia completa de este gen, que se corresponde con el locus AT2G26430 de esta base de datos.

La pauta de lectura de la secuencia mostrada en la figura 6 es 5'-3'. La secuencia de color negro de la parte superior se corresponde con la región promotora del gen, después la región en rojo se corresponde con la región UTR (UnTranslated Region) del gen, es decir la región que se transcribe pero no se traduce, que se encontrará en el mRNA maduro, pero no codificará para proteína. Las regiones de color azul, corresponden con intrones, que serán eliminados por la maquinaria del splicing después de la transcripción. Hay que indicar que la posición de estos intrones teóricos ha sido confirmada de forma experimental gracias a la clonación del c-DNA del gen (Forment et al., 2002). Por último tenemos las regiones en verde, que son los exones, es decir, las regiones que codifican para la traducción de la proteína. Los codones encuadrados en amarillo se corresponden con los codones de inicio de la traducción, 5'-ATG-3', y de terminación de ésta 5'-TAA-3'.

Hay que indicar que el gen está compuesto por seis exones y seis intrones, uno de los cuales está en la región UTR.

```

TGTTTTGTTTGTCTTCGTTAGACGACAAAAACAATACTTTTTGGTTGAATATTCGATCGATCGTGT
AAGTAAATATAGTATATAGAGAAAACGATGTCCTGATTGTTTAAATTTGGATTTTGATTGTTAGT
AATAAGATCACATTCACATCGGTTACTATTTAATAAGATCTGTAAGATTGAAACAATCTCTCTTTAAC
GATAACTACGAGGAACCATAACGTTTCAGGCAATGGTTTAGACTTTTAGACCCAACCCAGTCACAATT
GTATATTTGATCATAACGACACTTGGTCCATCCAGTCCCGGCTCAATTCATTATGGGACCTATTCGAAA
ACTCAAAAATAAAATAAAATTTCTTAGTAAAATTTTTTTTGGAAAAATGGGGCTTTTAGTCTTAACAA
TTTTTTGAAATTTGATTAGTAACGGCATTGCCTACGATGTGAAATATAAGTTTGATACATAAAATAAAGT
AATGATTGATTCTTGAATTGCTTTTTGTACTTCTAGATCAGTATTGATTACTTTATTTACGAGAAAATAGT
TCATTTAAGCACATTTATAGAAAAATGTTAAGTAAATGTTAAATAGGATAGTCCGATTAACCTATTAAT
TATGCAAAATTTCTTTCAAATAAAATAGGTACCCATAAAAAGGCCATTTAATTTCTAACTAACTACAAAT
GACATCGTTTATGTGTAGAGTTTGAGATTTACATTAATAATCTGATTTCAAACAACCTCTTCTTCTTC
ACTATAGTGTCTCGATTTTCGATCTTATCTTCTTTCCGAACCTCGACGAATCTCGAAATTTGATATGAATTTT
GAGTACCTTTACTGTAATTTTGTGTTTTATTTCGGATTGGTAGTTTCAATCTAAGAGCATACAAAAAAT
TATGGGCTGCATTTGTAACCTTTGATTTGAATATATTTTGGGGTCTAGCAATCAAAATTTTATTTTCCA
AATTTGAAATTTAATAATTTGTCGTTTGTCTCCCTGAATTTGGCAACACATTTAAAAATTTAGATGAT
GATCCATCAGAACTTTTATCGAAATTTTAAATTTAGATTATTTAACATCTATGGAAGGAGCAGAGACA
TCACCACAGTTCAAACAATCGATCTCTAAATAGTTAAATACATGATCATCGAATCTTAAAAACATTTT
TCTTCTTCTAAGCCCAATAAGGGCTAGTTAGAGTAGGCCAATTTATTTATTTCTTCTTTTGTGTA
ATTTCTTCTTTTTTTTCCCTCACTTCTCAACAACCTCGATTTCCCGATTTCCGTCGGCTCTCTCCGTC
TCCGCTC TCC TCGCCCGAGTCTGT TCCGCCCGCTATCTCCCAAT TCCGGTACATCC TAAACCATT T
CCCCTTTAATCCAACC TGTGTGATTTCTAATCGCGATTAATCTCAGTTAGGTTAAT TGC TTGATCTCA
GTTGAAAT TAGGGCGTAATCTCATTAC TAAATGTAGCAAAAA TCGACAATA TAGTCTCGTCTC TCTGTT
ATAGCAATCAATTTGAGATTCTGAAATTTGGCAGAA TCC TAATTTCTGAAGTTTGGCTAATATAGAAC
CTGTAATTTGTTT TTTTCATTTATGAGATGTTT TATTAACCTTTGTAGTCACAAATGATTTGATGAT
AATGTTCAATATTTGATTTTGTTC TCGTATGCGATAT TACGTTCTTTGGCTGTGATATCTGAAGTAAAGCT
GTTGTAATCTAAGTTTTCTTCTCTGATTTTAAACAGT GACCGT TGT TGT TTAGTGAATCGATGATTTAC
ACTGCTATCGACAATTTTACCTATCCGACGAGCAGTGAAGGCTTCACC TCGAGGAAAGATGGGATA
GATGAAACAAC TGAATCTCTCTTAGAATCTATGGATGTGATCTCATCCAAGAGGGTGAATTTGCTC
AACTGTA TCTTTTCTTGGTCTAATTTAAGCAAGACTCAAATGTTACGTAGCTGTGATTTCTTAA
CTTAGATTGTTTATTTTAGACCACAGGCAGTTATGGCTACTGGGCAGGTTCTGTTTCAGCGATCTATTTG
CAAGAAGTCTTTGGCTAAAATTTGATGTCAAGGTAAATTTTGT TTTCTTTCTAGTTTGTGTGTTTA
TGAAAGTATGATAATTTCTTAGGAGTGTATA TACTCTCGCTATGACCATAATGATTTGATATGTAGTTT
AATTTTACAGATAGTTGCTGCCAGCTGTGATGGCTTGCATCAAAACTGGAAGAAAACCTTAAAAAAG
CTAGACAGGTCATCATCGTAT TCCACAGGATGGAGTGTGCGAGGGAGA ACTTGCCATTAGAACCTCTGC
ATATGATGCCAAGTTAGTTTGC AATTTGTCATATTTGAATGTT TTTTTCGTATATTTTGT TCT
ACTCATGGGATAGCTTTATTTGGAAGTACTTTTATGGGATCTCATCTTTTTCCTACTTGTAAATATCTG
CAGAAGTTCTCTGAGTTGAAAGTTGAATTAAGCAGA ACTGAGAGACATATACTGAAAGAGATGGGTTT
TGT TGTGTCATGTTGAACATCTCACAAGTTTCAATCAAACTACCTTGCCACATTAGAACACCCTCCAGAA
TTGAGGCAAGAAAGCTTGGAAATTTGGCCAATGATAGGTAATCTCTATCTCAAAAATCC TAATATGGATAT
TATTTCAATATGATTTCTAATAGTTAGCTACACATCATAGTGTGATAGGTTT TAGAGTTGATGTTTATCC
TGAAGCTTGGCAATCTCC TGT TCTAGTTTGGATTTGAGTATGTTTGT TATACTTTCTCAATATCTGATAA
TTCTTTATGATTTTATCTTAAATCTCATGATATGCTATAATGCAAGTCTGCGTACAACCCTCTGTGAAGG
TTCAGAAGTGAGGTTGTGGCTTGTGGGGTAGTGTATGCTGCTGCCCGTAGGTTTCAAGTACCCTCCCT
GAGAAATCCGCCGTGGTGGAAAGCATTGATGCAGATAAACTAGTAT TGACGAAGTGTGTAGAGTTCTT
GCTCATTATACAGTCTTCAAAGGCTCAGTATATCTCTGTTTGAAGGATGGGAAGCCATTTACATTTT
CTAGCAGATCCGGGAATCTCAAGGTCAATCAGCGACAAAAGGTGAGGTAGATCGCTTTCTTGGTTTGT
AATTTTGTGAAAACATGAGAT TATGTCCATATTA CTGCTATATAGACTCTTAAAGTTGAGTGGGTTT
CTTACACAGTAGTAAACAGAGTTTCTACCACCACATTTGCA TGT TATATAGTATGAAAAAGGGCTGTCT
ACTTTATTTATTTCCGGCTTGGGAAAATCTGCAATCCAAAGTGCA TTTCTATGCTGTAAATCAGAGCTAGG
TTGAAGTGCTTTTAACTGT TACAGGATCTGTTGCCGGGAGCAGGCAGGCTGTTGATACTAAAATGTA
CTGCAGGATCAGCTAATAACGACTTGAAGGATGGAATGGTTACTACACCACAGGAAAAGGCTACAGAT
TCCAAGAAAAGTGGTACCGAGTCAAACCTCAGCCAATGTAGGAGACTCAAGCTATGAAAGAAAGTAA
AGTAGAGATAGAGAAAAGAGAGTGTATAGAGAGAAGGAAACGAGGTAGAGAGAGGGACAGGGGTAG
GTC TCACAGAGCGAGAGATTTGACAGAGACAGATGATAGGGAGAGAGACAAAAC TCAAAGATCGAAGT
CATCATCGGTCAAGAGACAGATTGAAGGATTCAGGTGGACATTCAGATAAAATCAAAGGCATCATTCTCT
CGGGACCGTGACTACCGGACTCATCGAAAGACCGTCTGAGGCACCATTAAGCCAACTCTCTTGTGATC
TACATCCCC TTGAGCTTACTTGTGTTAAGACAGTATAGTGTGTTATGTTGTTAAGAGTCAAAAACCCATG
TGTACTTAATCACATGCTAAGATCACGTTGGTTCGACATAAAAATCGAGAAAGTCTGATATGTTCTA
ATTTGAAATTTTGTGAAAAGTGCCTTAAACTTTGAAAAGTGGTTTTTTGACTTTTG

```

Fig. 6: Análisis de la secuencia nucleotídica de *RCY1*. Secuencia en sentido 5'-3' del gen AT2G26430 (*RCY1*). Se representa en verde los exones, en azul los intrones, en rojo las regiones UTR y encuadrados en amarillo la regiones de inicio y fin de la traducción.

El siguiente paso realizado fue traducir a secuencia proteica este gen, utilizando los servicios bioinformáticas prestados por el sistema EXPASY (Expert Protein Analysis System), del “Swiss Institute of Bioinformatics” (www.expasy.ch).

```

MIYTAIDNFYLTDEQLKASPSRKDGIDET
TEISLRIYGCGLIQEGGILLKLPQAVMAT
GQVLFQRFYCKKSLAKFDVKIVAASCVWL
ASKLEENPKKARQVIIVFHRMECRRELPL
EHLDMYAKKFSELKVELSRTERHILKEMG
FVCHVEHPHKFISNYLATLETPELRQEA
WNLANDSLRRTTLCVRFSEVVACGVVYAA
ARRFQVPLPENPPWKAFFDADKSSIDEVC
RVLAHLYSLPKAQYISVCKDGKPFTFSSR
SGNSQGQSATKDLLPGAGEAVDTKCTAGS
ANNDLKDGMVTPHEKATDSKKSGETESNS
QPIVGDSSYERSKVGDRERESDREKERGR
ERDRGRSHRGRSDRDSDRERDKLKDRSH
HRSRDRLKDSGGHSDKSRHHSRDRDYRD
SSKDRRRHH

```

Fig. 7: Análisis de la secuencia aminoacídica de RCY1.

Neutros-No polares	3-letras	1-letra
Glicina	Gly	G
L-Alanina	Ala	A
L-Valina	Val	V
L-Isoleucina	Ile	I
L-Leucina	Leu	L
L-Fenilalanina	Phe	F
L-Prolina	Pro	P
L-Metionina	Met	M
Neutros-Polares		
L-Serina	Ser	S
L-Treonina	Thr	T
L-Tirosina	Tyr	Y
L-Triptófano	Trp	W
L-Asparagina	Asn	N
L-Glutamina	Gln	Q
L-Cisteína	Cys	C
Ácidos		
L-Aspartico	Asp	D
L-Glutámico	Glu	E
Básicos		
L-Lisina	Lys	K
L-Arginina	Arg	R
L-Histidina	His	H

Fig. 8: Abreviatura de los aminoácidos.

En esta secuencia proteica (Ver figura 7), ya podemos empezar a observar algo determinante en la función de la proteína, su alto número de repeticiones de los dipéptidos RE/ER, RD/DR y RS/SR en el COOH-terminal, típico de proteínas SR.

4.1.2 “BLAST” DE RCY1

Esta herramienta (Basic Local Alignment Search Tool) nos permite observar si esta secuencia está conservada en otros organismos, y hasta qué punto. Es decir, podremos conocer si otros organismos, sólo de los que se disponga información, poseen un gen similar a RCY1.

Debido a la degeneración del código genético principalmente, es más preciso y útil realizar un BLAST con la secuencia proteica, así se evitarán problemas como la degeneración del código genético o la duplicidad de clones en genotecas distintas, que podrían dar lugar a conclusiones erróneas.

Para realizar este “blastp”, que compara uno a uno los aminoácidos, se utilizó la herramienta de EXPASY.

Referencia	Descripción y organismo	Coincidencia
tr Q94L33	_ARATH Ania-6a type cyclin [RCY1] [Arabidopsis thaliana...]	647 0.0
tr 046710	_ARATH Putative cyclin [At2g26430] [Arabidopsis thaliana...]	645 0.0
tr Q6R0W3	_ARATH Putative cyclin [At2g26430] [Arabidopsis thaliana...]	642 0.0
tr Q9A336	_ORYZA Putative ania-6a type cyclin (Os01g0377500 prote...)	496 e-139
sp Q9JJA7	CCNL2_MOUSE Cyclin-L2 (Cyclin Ania-6b) (Paneth cell-en...)	244 5e-63
tr Q2NLA6	_XENLA Hypothetical protein [Xenopus laevis (African cl...)]	240 7e-62
tr Q29I19	_DROPS GAL4208-PA (Fragment) [Dpse\GAL4208] [Drosophila...]	240 7e-62
tr Q70AJ2	_WHEAT Putative cyclin (Fragment) [p0416G11.6] [Triticu...]	239 1e-61
sp Q5IOH5	CCNL2_RAT Cyclin-L2 [Ccnl2] [Rattus norvegicus (Rat)]	238 4e-61
tr Q9W526	_DROME CG16903-PA (LD24704p) [EG:67A9.2] [Drosophila me...]	236 2e-60
tr Q17GM2	_AEDAE Cyclin 1 [AaeL_AAEL002866] [Aedes aegypti (Yello...)]	236 2e-60
sp Q72VX0	CCNL1_BRARE Cyclin-L1 [cnll1] [Brachydanio rerio (Zobr...)]	235 2e-60
sp Q96394	CCNL2_HUMAN Cyclin-L2 (Paneth cell-enhanced expression...)	233 6e-60
tr Q43RR6	_TETNG Chromosome undetermined SCAP14498, whole genome ...	232 2e-59
sp Q9UK58	CCNL1_HUMAN Cyclin-L1 (Cyclin-L) [CCNL1] [Homo sapiens...]	231 4e-59
sp Q5BKF8	CCNL2_XENTR Cyclin-L2 [cncl2] [Xenopus tropicalis (Wes...)]	230 7e-59
tr Q22NA6	_XENLA Hypothetical protein [Xenopus laevis (African cl...)]	230 7e-59
sp Q52KE7	CCNL1_MOUSE Cyclin-L1 (Cyclin-L) (Cyclin Ania-6a) [Ccn...]	229 1e-58
sp Q52JPP	CCNL1_CHICK Cyclin-L1 [CCNL1] [Gallus gallus (Chicken)]	229 2e-58
sp Q9RLQ2	CCNL1_RAT Cyclin-L1 (Cyclin-L) (Cyclin Ania-6a) [Ccnll...]	229 2e-58
tr Q4J3B8	_ANOGA Cyclin [D1.2] [Anopheles gambiae (African malari...)]	226 1e-57
tr Q9ULK6	_DROME EG:67A9.2 protein [EG:67A9.2] [Drosophila melano...]	226 1e-57
sp Q6GNL5	CCNL1_XENLA Cyclin-L1 [cnll1] [Xenopus laevis (African...)]	225 2e-57
tr Q7PXZ9	_ANOGA ENSANGP00000006543 (Fragment) [ENSANGG0000000643...]	225 2e-57
tr Q54N22	_DICDI Cyclin [cycL] [Dictyostelium discoideum AX4]	221 5e-56
tr Q64HW7	_ONCMY Cyclin L1 [Oncorhynchus mykiss (Rainbow trout) (...)]	219 2e-55
tr Q4V910	_BRARE LOC553269 protein (Fragment) [LOC553269] [Brachy...]	216 2e-54
tr Q7JLC3	_CAEEL Hypothetical protein cycl-1 (Cyclin L) [cycl-1] [C...]	202 2e-50
tr Q8T356	_PLAFA Putative cyclin 4 [cyc-4] [Plasmodium falciparum] ...	170 6e-41
tr Q76NM8	_PLAF7 Cyclin 4 [cyc-4] [Plasmodium falciparum (isolate...)]	170 6e-41
tr Q4XQB3	_PLACH Cyclin 4, putative [PC000306.04.0] [Plasmodium c...]	169 2e-40
tr Q425X0	_PLABE Cyclin 4, putative [PB000504.00.0] [Plasmodium b...]	166 1e-39
tr Q7R3X7	_PLAYO Cyclin, putative [PY00225] [Plasmodium yoelii yo...]	164 5e-39
sp_vs Q9JJA7-2	Isoform 2 of Q9JJA7 [Ccnl2] [Mus musculus (Mouse)]	154 6e-36
sp_vs Q9JJA7-3	Isoform 3 of Q9JJA7 [Ccnl2] [Mus musculus (Mouse)]	154 6e-36
sp_vs Q5IOH5-2	Isoform 2 of Q5IOH5 [Ccnl2] [Rattus norvegicus (R...)]	153 1e-35
sp_vs Q96394-2	Isoform 2 of Q96394 [CCNL2] [Homo sapiens (Human)]	151 4e-35
tr Q2Q035	_ORYZA Cyclin family protein, putative, expressed [Os12...]	146 1e-33
sp_vs Q9UK58-4	Isoform 4 of Q9UK58 [CCNL1] [Homo sapiens (Human)]	146 1e-33
tr Q53NC8	_ORYZA Cyclin, N-terminal domain, putative [LOC_0511g05...]	139 2e-31
tr Q9D614	_MOUSE Adult male small intestine cDNA, RIKEN full-leng...]	139 3e-31
sp_vs Q52KE7-2	Isoform 2 of Q52KE7 [Ccnll] [Mus musculus (Mouse)]	138 4e-31
tr Q8GYM6	_ARATH Hypothetical protein At4g19600/P24J7_161 [At4g19...]	136 2e-30
tr Q9FKE6	_ARATH Similarity to cyclin [Arabidopsis thaliana (Mous...)]	135 4e-30
tr Q6Z7H4	_ORYZA Cyclin K-like [OJ1570_HL2.4-1] [Oryza sativa (ja...)]	133 1e-29
tr Q4UJ60	_THEAN Cyclin, putative [TA09750] [Theileria annulata]	133 1e-29
tr Q626I8	_ORYZA Cyclin T2-like protein [P0030G11.11] [Oryza sati...]	128 5e-28
tr Q54LJ0	_DICDI Cyclin [cycK] [Dictyostelium discoideum AX4]	128 5e-28
tr Q4N6F4	_THEPA Cyclin, putative [TP01_1216] [Theileria parva]	127 6e-28
tr Q9C8P7	_ARATH Hypothetical protein F12A4.13 [F12A4.13] [Arabid...]	127 1e-27
tr Q1E1L4	_COCIM Hypothetical protein [CIMG_03549] [Coccidioides ...]	127 1e-27
tr Q55RK3	_CRYNE Hypothetical protein [CNBE4090] [Cryptococcus ne...]	126 1e-27
tr Q5KGC6	_CRYNE Cyclin-dependent protein kinase regulator, putat...]	126 1e-27
tr Q4WXM8	_ASPFU Cyclin, N-terminal domain, putative [Afu3g10070]...]	125 2e-27
tr Q7Q3R8	_ANOGA ENSANGP00000012356 [ENSANGG00000009867] [Anophel...]	124 5e-27
tr Q23IB9	_TETTH Cyclin, N-terminal domain containing protein [TT...]	124 7e-27
tr Q16IU9	_AEDAE Cyclin k [AaeL_AAEL013531] [Aedes aegypti (Yello...)]	124 9e-27
tr Q4P9M0	_USTMA Hypothetical protein [UM03193.1] [Ustilago maydi...]	123 2e-26
tr Q2UL57	_ASPOR CDK9 kinase-activating protein cyclin T [A009000...]	122 2e-26
tr Q4J3B9	_ANOGA Cyclin [D1.2] [Anopheles gambiae (African malari...)]	120 6e-26
tr Q0IFP0	_AEDAE Cyclin t [AaeL_AAEL004839] [Aedes aegypti (Yello...)]	120 1e-25
tr Q5B399	_EMENI Hypothetical protein [AN4981.2] [Emericella nidu...]	119 2e-25
tr Q2MOU3	_DROPS GAL9492-PA (Fragment) [GAL9492] [Drosophila pseu...]	115 3e-24
tr Q6PFP0	_BRARE Wu:fi75b02 protein (Fragment) [wu:fi75b02] [Brac...]	114 9e-24
sp Q5PD50	CCNL1_PONPY Cyclin-L1 [CCNL1] [Pongo pygmaeus (Orangut...)]	113 1e-23
sp Q75909	CCNK_HUMAN Cyclin-K [CCNK] [Homo sapiens (Human)]	113 1e-23
tr Q0V9U3	_XENTR Hypothetical protein [Xenopus tropicalis (Wester...)]	113 1e-23
tr Q5ZL28	_CHICK Hypothetical protein [RCJM804_6b6] [Gallus gallu...]	113 1e-23
tr Q566H0	_XENLA Hypothetical protein [Xenopus laevis (African cl...)]	113 1e-23
tr Q3U3H2	_MOUSE NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKE...]	113 1e-23
tr Q3U3M5	_MOUSE NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKE...]	113 1e-23
tr Q4R9E7	_MACFA Testis cDNA clone: QtsA-10146, similar to human ...]	113 1e-23
sp_vs Q75909-2	Isoform 2 of Q75909 [CCNK] [Homo sapiens (Human)]	113 1e-23
sp_vs Q9UK58-5	Isoform 5 of Q9UK58 [CCNL1] [Homo sapiens (Human)]	113 1e-23
sp_vs Q52KE7-3	Isoform 3 of Q52KE7 [Ccnll] [Mus musculus (Mouse)]	113 1e-23

Fig. 9: Análisis de la secuencia aminoacídica de RCY1. BLAST de la secuencia de aminoácidos de RCY1.

Como resultado de este análisis, observamos (Ver figura 9) un cuadro que nos indica en la primera columna, la referencia de la secuencia con similaridades (Referencia en la Figura 6), es decir en que base de datos y con que número podemos encontrar esa secuencia, en la segunda columna podemos ver una definición del gen que aparece, y a que organismos pertenece. En la última columna (Coincidencia) vemos un índice de coincidencia que se muestra en dos valores, el primero es el número total de aminoácidos en igual posición, y que viene expresado en bits, y el segundo es el error al afirmar estadísticamente que ambas secuencias son la misma (p-valor). Cuanto mayor sea el número de bits menor será el p-valor, y más iguales serán las secuencias.

En este caso las tres primeras (Ver figura 9) secuencias corresponden con la proteína en *Arabidopsis thaliana* y el resto son proteínas de otros organismos, evitándonos así en cierta manera la duplicidad de aparición de clones incompletos.

Aparecen, tras éstas, y con mucha similitud, proteínas de arroz, ratón, rana (*Xenopus laevis*), mosca, etc.... Este p-valor tan bajo, y tal multitud de organismos en los que se ha encontrado la proteína, nos indican que es una proteína conservada a lo largo de la evolución.

En siguiente árbol (Ver figura 10), se observan gráficamente los clados ordenados por similitud con respecto a RCY1. Este análisis se ha realizado utilizando la herramienta de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), y nos muestra aún más organismos que poseen una secuencia similar.

Como se puede observar en él, las proteínas más parecidas las poseen otras plantas, arroz y trigo, seguidas de otros organismos como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*. A mayor distancia se encuentran los vertebrados, aunque en ellos también se encuentran proteínas similares.

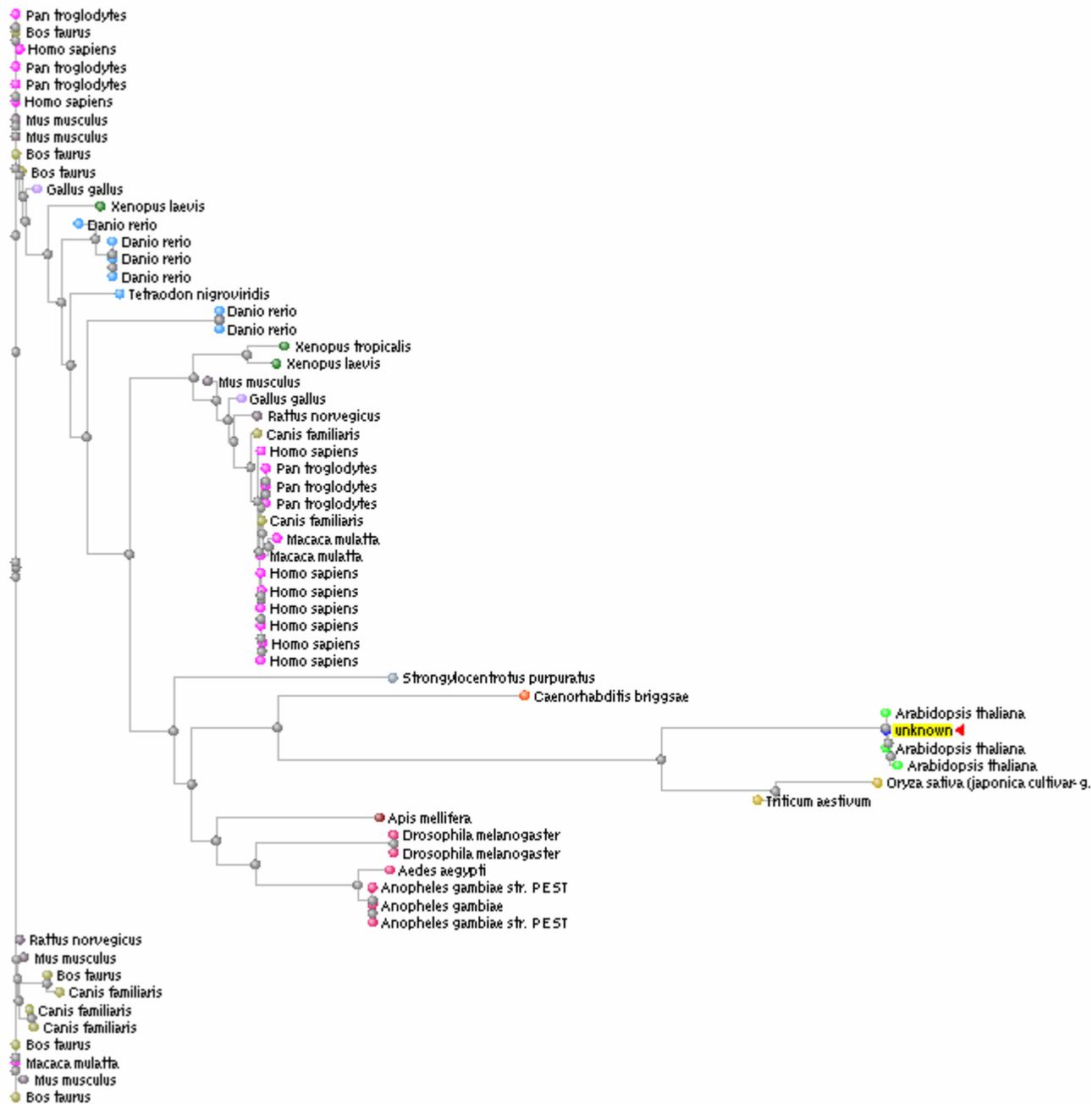


Fig. 10: Árbol de similitud de proteínas. Compara RCY1 con proteínas de otros organismos, para finalmente agruparlas por clados de similitud.

Para finalizar, hay que indicar, que durante el análisis, se obtuvo que en la secuencia introducida, existía un dominio ciclina conservado. Es decir, estos programas agrupan todos los dominios conocidos que aparecen en las proteínas similares, y emite un juicio acerca de que dominio puede aparecer en la secuencia introducida. Así, estos programas han descrito que en la secuencia de aminoácidos de RCY1, existe un dominio ciclina, más concretamente un dominio similar a la ciclina N.

Esto último nos indica, que esta proteína no puede clasificarse a priori, como una proteína SR convencional, que estaría formada por un dominio SR y uno de unión a RNA, sino que estamos hablando de una ciclina, con un dominio RS COOH-terminal, es decir en el carboxi terminal de esta ciclina aparece un dominio con alto número de repeticiones del dipéptido RS y RE. Pudiéndose clasificar también como una proteína tipo SR, o “SR like”.

4.1.3 ESTRUCTURA PRIMARIA

Para poder conocer algunos datos acerca de la estructura primaria de la proteína codificada por el gen *RCY1*, se utilizó el servicio EXPASY.

En primer lugar se procesó la secuencia para obtener las características físico-químicas de la molécula, gracias al programa ProtParam (Gasteiger et al., 2005).

Number of amino acids: 415		
Molecular weight: 47455.3		
Theoretical pI: 9.07		
Amino acid composition:		Atomic composition:
Ala (A) 27	6.5%	Carbon C 2049
Arg (R) 42	10.1%	Hydrogen H 3278
Asn (N) 10	2.4%	Nitrogen N 632
Asp (D) 34	8.2%	Oxygen O 636
Cys (C) 10	2.4%	Sulfur S 16
Gln (Q) 12	2.9%	Formula: C ₂₀₄₉ H ₃₂₇₈ N ₆₃₂ O ₆₃₆ S ₁₆
Glu (E) 30	7.2%	Total number of atoms: 6611
Gly (G) 22	5.3%	Estimated half-life:
His (H) 16	3.9%	The N-terminal of the sequence considered is M (Met).
Ile (I) 15	3.6%	The estimated half-life is:
Leu (L) 32	7.7%	30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
Lys (K) 33	8.0%	>20 hours (yeast, in vivo).
Met (M) 6	1.4%	>10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Phe (F) 13	3.1%	Instability index:
Pro (P) 16	3.9%	The instability index (II) is computed to be 49.40
Ser (S) 41	9.9%	This classifies the protein as unstable .
Thr (T) 18	4.3%	
Trp (W) 4	1.0%	
Tyr (Y) 11	2.7%	
Val (V) 23	5.5%	
Asx (B) 0	0.0%	
Glx (Z) 0	0.0%	
Xaa (X) 0	0.0%	
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 64		
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 75		

Fig. 11: Estructura primaria de RCY1. Análisis de la estructura primaria de la secuencia proteica de RCY1, gracias al programa ProtParam de EXPASY.

Gracias a este análisis obtenemos datos teóricos como el peso molecular, 47455.3Da o la fórmula atómica. Como datos más destacados obtenemos el alto punto isoeléctrico, es decir estamos ante una proteína muy básica, y la presencia de un gran porcentaje de aminoácidos Arginina y Serina (Aproximadamente el 10% cada uno), típico de los dominios RS. También, obtenemos que la proteína es inestable. Para afirmar esto, el programa compara la secuencia del gen de estudio con una base de datos de proteínas, de las que se conoce empíricamente su índice de estabilidad.

Por tanto, los datos más importantes que obtenemos de este análisis, y que sirven para posteriores explicaciones de mecanismos de acción, son la basicidad general, y la inestabilidad.

También se llevaron a cabo una serie de análisis, que predicen si teóricamente aparecen ciertas estructuras es la proteína. Así, se uso el programa Paracoil (Berger et al., 1995), que predice si existen giros o hélices, el programa 2ZIP (Bornberg-Bauer et al., 1998) que predice cremalleras de leucina y el ProtScale (Gasteiger et al. 2005) que predice lugares hidrofóbicos en la proteína. Todos estos análisis dieron resultado negativo, por lo que la proteína no tiene hélices (Coiled coils), cremalleras de leucina, ni regiones hidrofóbicas.

4.1.4 ESTRUCTURA SECUNDARIA

En este caso y usando el mismo servidor de programas que en el apartado anterior, se computa la secuencia para la clarificación de la estructura secundaria teórica.

El programa escogido fue el JPred (Cluf et al., 1998), que compara secuencias con estructura secundaria conocida a la de la proteína problema. El resultado fue, que el programa encontró un total de **7 hélices** en la secuencia.

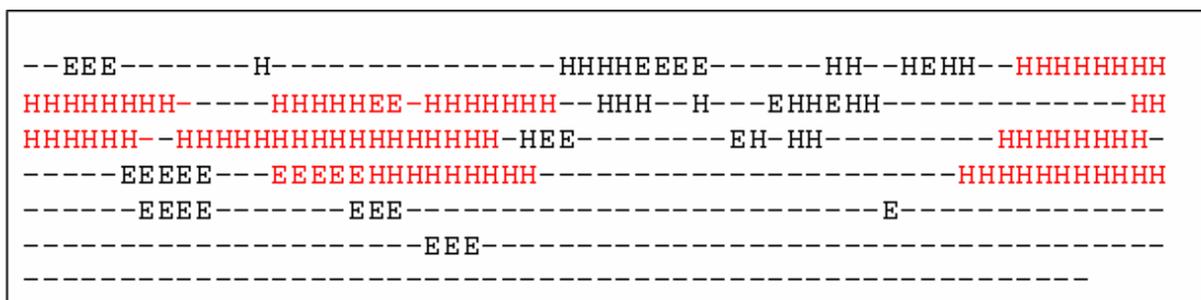


Fig. 12: Análisis de la estructura secundaria de RCY1. En rojo, podemos observar las secuencias con suficiente entidad como para formar hélices en la estructura terciaria. Cada carácter corresponde a un aminoácido de la secuencia primaria.

Estas regiones poseen un alto índice hidrofílico, lo que provoca que esta proteína sea clasificada como hidrofílica.

4.1.5 ESTRUCTURA TERCIARIA

Para generar una estructura tridimensional de la proteína se utilizó el programa spdbviewer (Peitsch, 1995; Guex, 1997; Schwede 2003), que utiliza como modelo estructuras de proteínas cristalizadas, para compararlas con la secuencia problema.

Así, como observamos en la figura 13, aparecen todas las hélices predichas como tal en el apartado anterior. Hay que indicar que estas estructuras se localizan concretamente en el dominio ciclina. El dominio RS carece de estructura previsible, por lo que puede que quede libre para poder interactuar con otras proteínas.

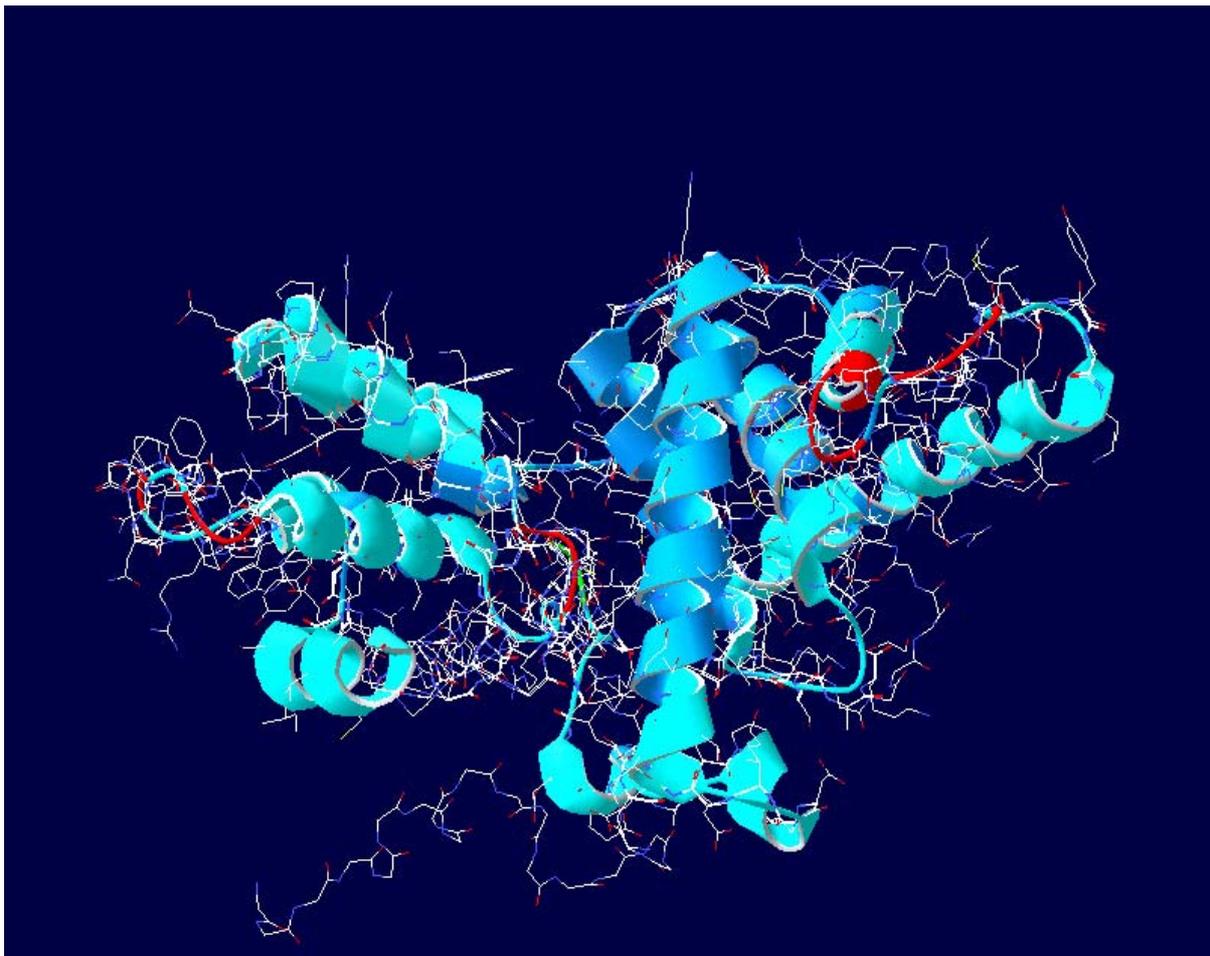


Fig. 13: Análisis de la estructura terciaria de RCY1. Estructura tridimensional de la proteína codificada por RCY1.

4.1.6 MODIFICACIONES POST-TRANSCRIPCIONALES DE LA PROTEÍNA

Se sometió la secuencia a varios programas, que predicen este tipo de modificaciones:

- NetNGlyc (Gupta et al., 2004): predicción de sitios de N-Glicosilación. El resultado fue **negativo**.
- NetOGlyc (Julenius et al., 2005): predicción de sitios de O-Glicosilación. En este caso existen múltiples secuencias con alta probabilidad de ser O-Glicosiladas. Se muestran en la figura 14 como líneas verticales azules.

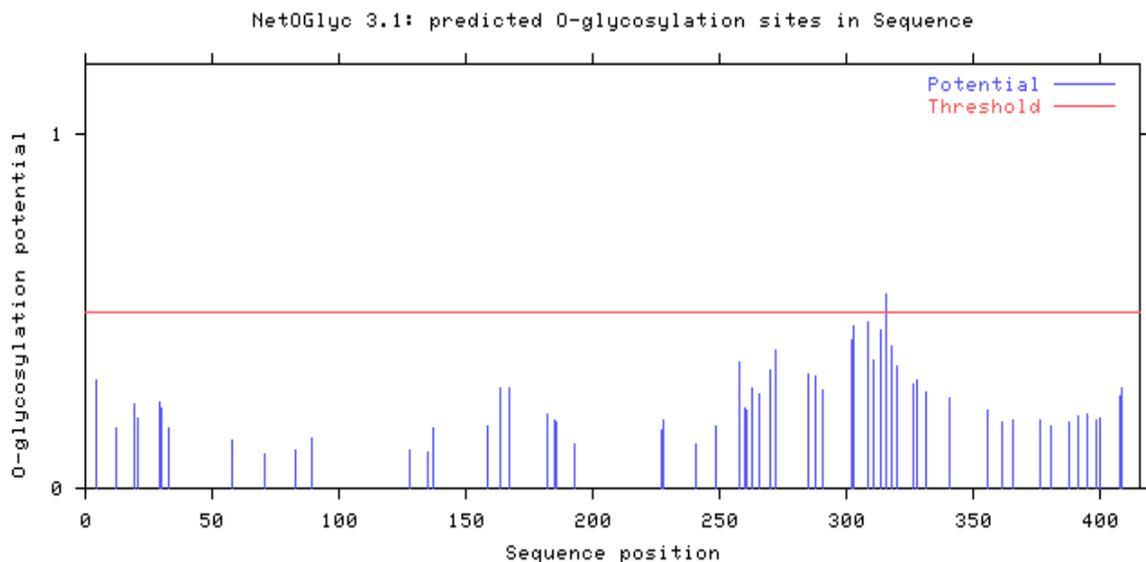


Fig. 14: Probabilidad de O-Glicosilación de RCY1. Cuanto más se acerquen las líneas verticales, a la horizontal rojo, mayor probabilidad en esa posición (Eje X).

Esta modificación puede indicar, desde una mayor tolerancia de la proteína a estrés oxidativo (Mishra et al., 2003), hasta una señal de sublocalización celular.

- NetPhos (Blom et al., 1999): Predice la probable fosforilación de residuos. En este caso el resultado también es positivo. Existen varios residuos de probable fosforilación (Ver figura 15). La fosforilación es importante para la localización subcelular general (Kawakami et al., 1999), pero sobre todo, sirve para localizar subcelularmente en el núcleo y hacer funcionales a proteínas ciclinas (Li et al., 2006) y hacer lo mismo con proteínas con dominio RS (Ali et al., 2003).

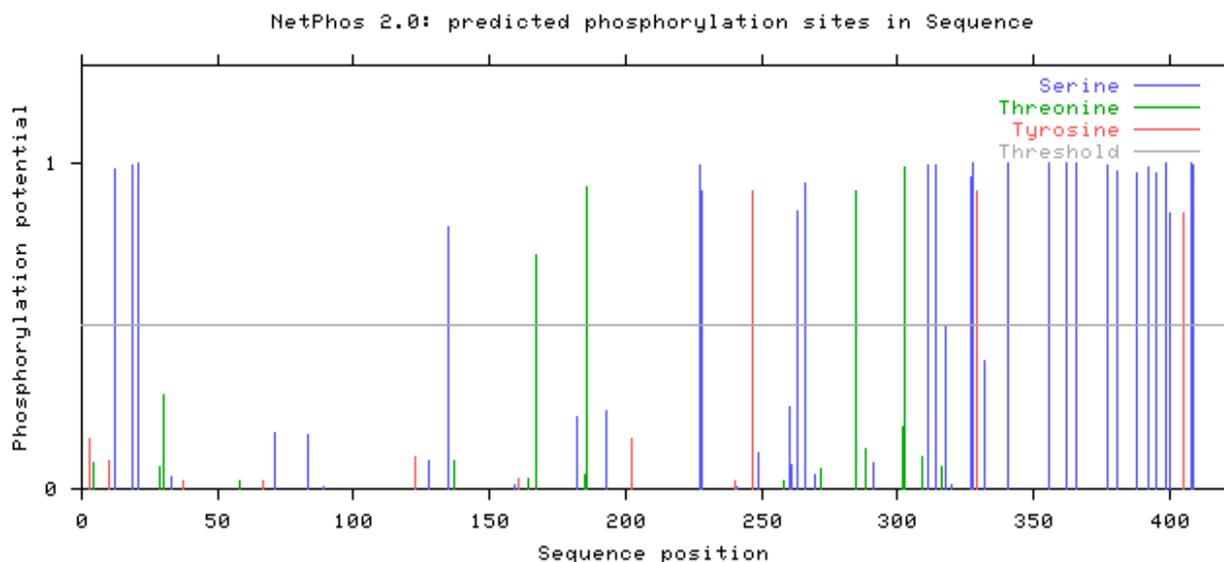


Fig. 15: Lugares de posibles fosforilación de RCY1. Cuando las líneas verticales, superan la horizontal gris, hay una alta probabilidad de que se fosforilen los residuos en la posición marcada por el eje X.

Por tanto, al existir tantos residuos fosforilables, es muy probable que influyan en la localización y funcionalidad de la proteína. A todo esto, hay que añadirle que al menos otra proteína cuya sobreexpresión en levadura otorga tolerancia a sal, y tiene un dominio SR, la proteína SRL1 de *Arabidopsis thaliana*, sin fosforilar, no otorga tolerancia a sal en levaduras (Forment et al., 2002). Así, podemos deducir que en plantas también será importante el hecho de que esta proteína esté fosforilada y pueda localizarse correctamente. Es decir, localización por fosforilación y tolerancia a sal pueden estar relacionadas.

- Sulfinator (Monigiatti et al., 2002): predice la posible adición de grupos sulfito a residuos de Tirosina. Hay un resultado positivo en el residuo 405, aunque no es considerado como importante.
- SumoPlot (Xue et al., 2006): predice lugares de Sumolización. El resultado es positivo para varios residuos (Ver figura 16).

1	MIYTAIDNFY	LSDEQLKASP	SRK BD GIDETT	EISLRIYGCD	LIQEGGIL LK
51	LP QAVMATGQ	VLFQRFYCKK	SL AKFD VKIV	AASCVWLASK	LEENPKKARQ
101	VIIIVFHRMEC	RRENLPLEHL	DMY AKKF SEL	KVEL SRTERH	ILKEMGFVCH
151	VEHPHKFISN	YLATLETPPE	LRQEAWNLAN	DSLRTTLCVR	FRSEVVACGV
201	VYAAARRFQV	PLPENPPW WK	AF DADKSSID	EVCRVLAHLY	SLPKAQYISV
251	CKD GKPF TFSS	SRSNSQSQS	ATKDLLPGAG	EAVDTKCTAG	SANND LKDGM
301	VTT PHE KATD	SKKSG TESNS	QPIVGDSSYE	RSKVGDRERE	SDREKERGRE
351	RDRGRSHRGR	DSDRDSDRER	DKLKDRSHHR	SRDRLKDSGG	HSDKSRHHSS
401	RDRDYRDSSK	DRRRHH			

Fig. 16: Análisis de posibles secuencia de sumolización de RCY1. En rojo observamos los lugares con alta probabilidad de sumolización, y en azul los que tienen menos probabilidad, pero esta existe.

La sumolización es un proceso similar a la ubiquitinación, pero en general inverso, es decir, es cuando desaparece la proteína SUMO, cuando se degrada o inactiva la proteína, aunque este es un mecanismo aún incipiente y queda mucho por conocer (Novatchkova et al., 2004).

Por tanto puede que este proceso sea importante en la funcionalidad, y por tanto en el mecanismo de tolerancia a sal gracias a RCY1.

4.1.7 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Utilizando el programa TargetP (Emmanuelsson et al., 2000) para localizar subcelularmente la proteína, se obtiene que la proteína codificada por *RCY1*, se localizará en el núcleo, con un 92% de probabilidad, porcentaje muy alto que nos indica que esta proteína es nuclear.

Lo mismo ocurre al utilizar el programa PSORT (Bannai et al., 2002). Este programa nos indica que la localización más probable de RCY1 se el núcleo.

También se utilizó una serie de programas que analiza si aparecen péptidos señal de sublocalización en algunos orgánulos:

- ChloroP (Emmanuelsson et al., 1999): predice péptidos señal de localización cloroplástica. El resultado fue **negativo**.
- Mitoprot (Claros and Vincens, 1996): predice la probabilidad de que la proteína se localice en la mitocondria, gracias a los péptidos señal. La probabilidad obtenida fue de 0.069, es decir, **muy improbable**.
- PTS1 (Neuberger et al., 2003): predice la aparición de señales de localización en peroxisomas. El resultado fue *negativo*.

Después de observar estos datos, podemos deducir que la localización subcelular más probable de RCY1 sea el núcleo.

4.1.8 ANÁLISIS DEL PROMOTOR DE RCY1.

La secuencia promotora de este gen, obtenida de la base de datos del TAIR, fue sometida a análisis, utilizando los programas PLACE (Higo et al., 1999) y PlantCare

(Rombauts et al., 1999; Lescot et al., 2002). Estos programas comparan la secuencia sometida a estudio, con secuencias promotoras comprobadas empíricamente.

Al someter la secuencia en ambos programas, se obtiene un elevado número de coincidencias, de las cuales, se tendrá que hacer una criba, con respecto a la posición obtenida, ya que estamos hablando de elementos en cis.

Al realizar la criba seleccionada, obtenemos los elementos pertenecientes a cajas TATA, amplificadores AAGAA y cajas CAAT, que son más o menos ubicuos en todos los promotores. Como secuencias características, y que coinciden en cis, encontramos sobre todo elementos de respuesta a luz L-box, elementos de expresión en polen LAT52 y TC-box, que son elementos de respuesta a estrés en general.

Así que tomando estos datos obtenidos, sólo como referencia para posteriores comprobaciones empíricas, se prosigue con el análisis bioinformático.

4.1.9 NORTHERN DIGITAL DE RCY1

Para poder realizar esta tarea, se requiere una base de datos que aglutine los resultados de decenas de “Microarrays” realizados con diferentes condiciones. En este caso se va a utilizar la base de datos Genevestigator (Zimmerman et al., 2004) que engloba un total de 2507 experimentos de expresión en distintas situaciones. Después, al introducir el gen de estudio, el motor de búsqueda del programa hace una compilación de todos los experimentos en los que aparece dicho gen y los clasifica según tejidos donde se exprese, o tratamientos de estrés.

Antes de proceder a desarrollar los resultados para *RCY1* (At2g26430), hay que indicar que estos resultados, de ninguna manera pueden ser tomados como definitivos, debido principalmente a las limitaciones técnicas de los “Microarrays”, es decir, muchas veces se generalizan resultados gracias a esta técnica, que sólo se deben aplicar al experimento con sus controles. Como ejemplo nos serviría un gen de respuesta tardía a ABA. Si en el experimento se utilizan muestras tomadas a tiempos cortos, este programa no detectaría que el gen se expresa, ya que lo hace a tiempos largos, y concluiría, que no es de respuesta a ABA.

En primer lugar se obtuvieron los datos para los diferentes órganos de la planta (Ver figura 17).

4.2 EXPRESIÓN DEL GEN *RCY1*

Se pretende cuantificar los niveles en los que la expresión del gen *RCY1* varía en distintas situaciones, ya sea realizando diferentes tratamientos estresantes, fitohormonales, o simplemente observar la expresión de este gen en los diferentes órganos de la planta. Con estos datos podremos conocer mejor la función biológica del gen en condiciones normales y de estrés

Para cuantificar el nivel de expresión de este gen, se utilizaron dos técnicas distintas, “Northern blot” y RT-PCR. El análisis Northern es cuantitativo, por el contrario de la RT-PCR, que es un método de medida de la expresión semicuantitativo, ya que está sujeto a la acción enzimática de las polimerasas de DNA, que pueden actuar de distinta forma en distintos pocillos de la PCR. A pesar de esto, se escogió este método porque el umbral de detección del RNA es más bajo, es decir, puede detectar cantidades menores de RNA, que en un análisis Northern no hubieran aparecido.

De esta forma, se usó el “Northern blot” para tratamientos a tiempo largo y la RT-PCR, para tratamientos cortos y observación del nivel de expresión basal.

4.2.1 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *RCY1* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

4.2.1.1 TRATAMIENTO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SALES (NaCl y LiCl): PLANTAS EN MACETA Y LARGA DURACIÓN

Para observar si se produce inducción de la expresión de *RCY1* por sal, al tratar plantas silvestres con NaCl y LiCl, se diseñó un bioensayo que consistió en tratar plantas de 15 días con distintas concentraciones de estas dos sales. Transcurridos 4 días después de la adición de dichas sales, se recolectaron varias plantas de cada tratamiento y se extrajo el RNA.

Se cargaron 20µl de RNA por cada tratamiento, y se realizó el análisis Northern.

Se utilizó una sonda de RNA marcado radiactivamente por transcripción “in Vitro”, a partir de un pBluescript que tenía clonado en su "polylinker" el dominio RS de *RCY1*. Se utilizó, por tanto, sólo este dominio como sonda.

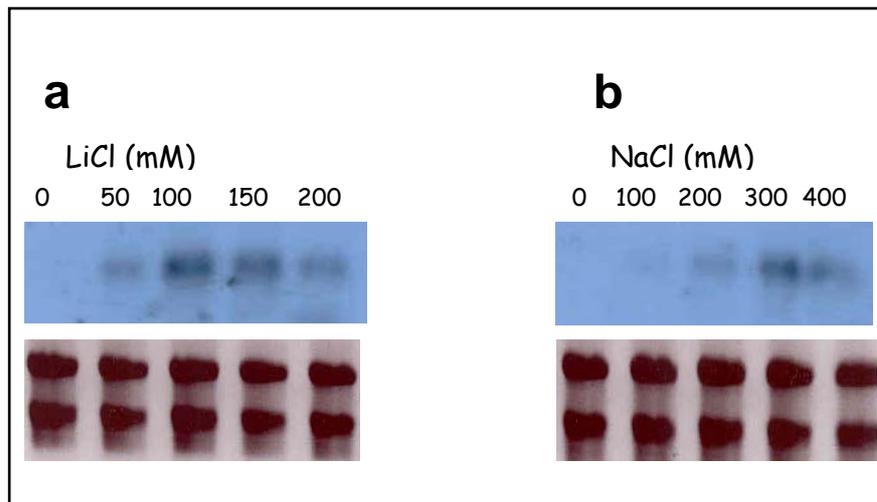


Fig. 19: Inducción de la expresión de *RCY1* en condiciones de estrés salino. Análisis Northern de la expresión de *RCY1*, después de tratamientos con distintas concentraciones de LiCl (a) y NaCl (b). Cada calle contiene 20 μ g de RNA total de plantas empezadas a tratar, con las cantidades indicadas (mM) bajo cada calle, a los 15 días de la germinación y durante 4 días en ambos casos. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

Como se puede observar en la figura 19, la expresión de *RCY1* aumenta al elevar la concentración de sales. Es decir, el aumento de la molaridad de NaCl y LiCl provoca que en la planta se acumule más mensajero del gen *RCY1*, existiendo unos máximos de concentración del mRNA al tratar con 100mM de LiCl, y 300mM de NaCl. El posterior descenso en la cantidad de RNA de *RCY1*, podría ser debido al aumento de la degradación general provocada por altas concentraciones salinas (Abler & Green, 1996). Es decir, a altas concentraciones de estas sales, en la célula vegetal comienza un proceso de degradación de RNA, que provoca también la degradación del RNA de *RCY1*.

Si se usa el LiCl también, es porque esta sal es más tóxica que el NaCl, es decir provoca el mismo efecto a menor concentración. Así, evitamos que al efecto tóxico de la sal se le sume un efecto osmótico (Huh et al., 2002; Munns, 2002), pudiendo distinguir entre ambos y precisar más sobre el mecanismo en el que actúa *RCY1*.

Es por esto que se ha realizado esta prueba con ambas sales, obteniendo como resultado que el LiCl afecta a la expresión de este gen a menor concentración. Esta situación nos permitirá poder usar esta sal a una concentración (100mM) que active en menor medida los mecanismos de acción contra estrés osmótico, pudiendose distinguir mejor el componente tóxico del estrés salino.

4.2.1.2: TRATAMIENTO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SALES (NaCl y LiCl): CULTIVOS LÍQUIDOS Y CORTA DURACIÓN

Este sistema se utilizó como alternativa al método anterior y gracias a él se pretende observar como reacciona la expresión de *RCY1*, en un periodo más breve de tiempo. Por esto se decidió usar la combinación entre cultivo líquido de *Arabidopsis thaliana*, que permitirá que las sales lleguen antes a los distintos tejidos que en el caso de las macetas, y RT-PCR que posee mayor sensibilidad, permitiéndonos detectar las variaciones de la expresión a menor concentración.

El experimento que se diseñó consistía en germinar las semillas en este medio durante 15 días. Posteriormente se añadía en cada matraz una cantidad distinta de cada sal (NaCl y LiCl), deteniéndose la actividad fisiológica de la planta a los 30 minutos con nitrógeno líquido. Finalmente se procedía al análisis por RT-PCR.

El ensayo se llevó a cabo usando los cebadores RS-F1 y RS-R1, que amplifican la región correspondiente al dominio RS de *RCY1*.

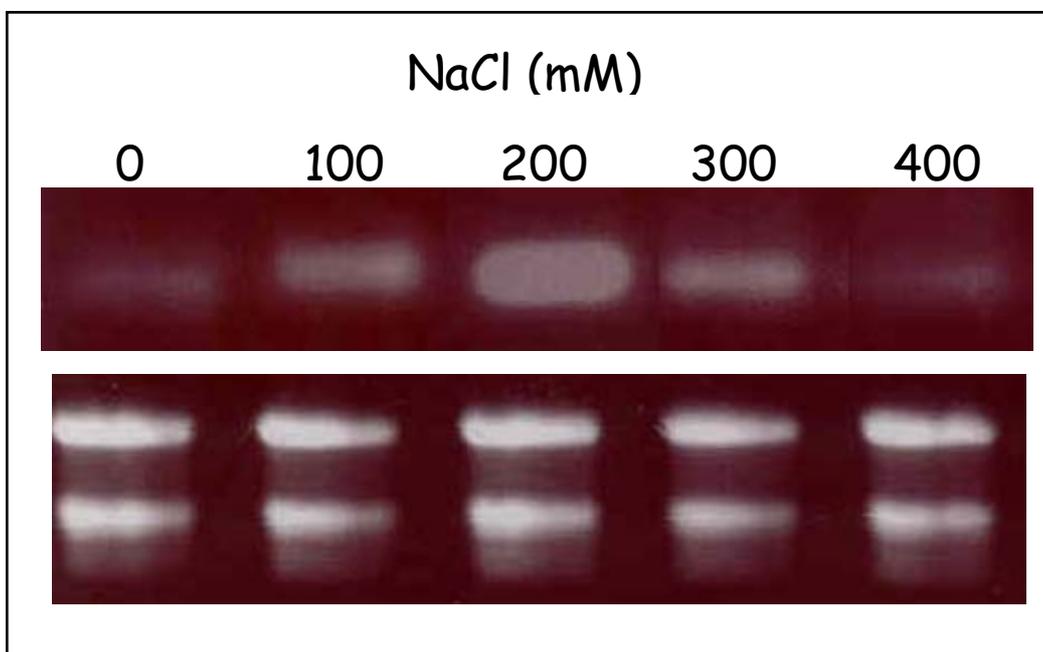


Fig. 20: Inducción de la expresión de *RCY1* en condiciones de estrés salino. Análisis RT-PCR de la expresión de *RCY1* al añadir diferentes concentraciones de NaCl. La reacción se realizó a 32 ciclos y con 0,5µg de RNA total. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

Como podemos observar en la figura 20 existe un nivel de expresión basal, indetectable por el método Northern. Este nivel inicial, se ve incrementado al añadir NaCl, existiendo un máximo a los 200mM de esta sal. Como ocurriera también en el análisis a tiempos largos, sobrepasado este máximo, existe un descenso en los niveles de *RCYI*, que son achacados también al proceso de degradación de RNA (Ver apartado anterior).

La misma situación exacta ocurre al tratar con LiCl.

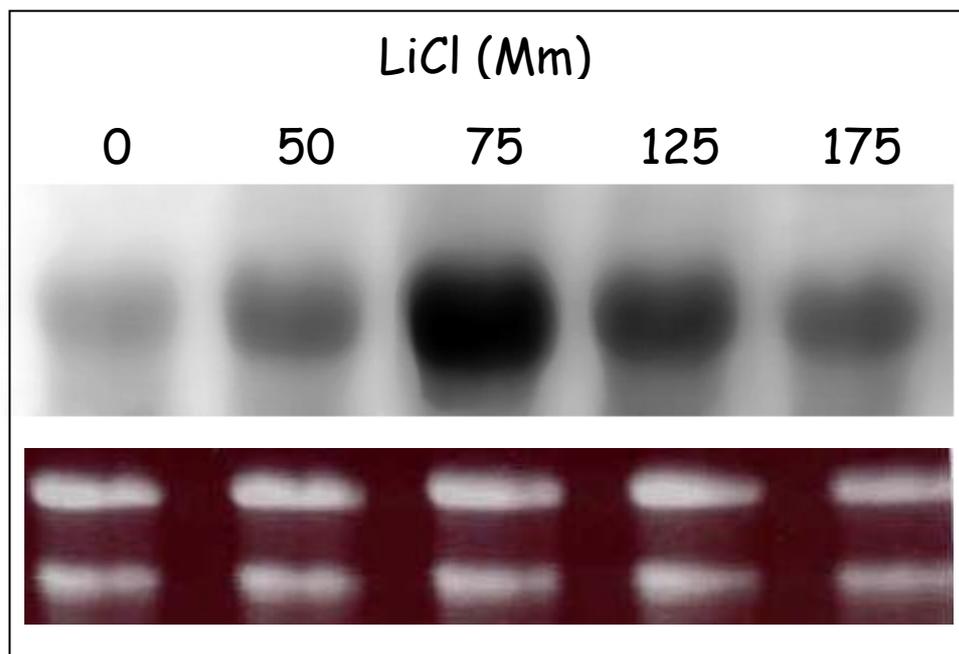


Fig. 21: Inducción de la expresión de *RCYI* en condiciones de estrés salino. Análisis RT-PCR de la expresión de *RCYI* al añadir diferentes concentraciones de LiCl. La reacción se realizó a 32 ciclos y con 0,5µg de RNA total. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

Existe también un máximo de expresión y un posterior descenso, siendo este máximo menor que en el caso del tratamiento en maceta; 75mM frente a 100mM respectivamente. Las causas de este fenómeno son atribuidas al efecto anteriormente nombrado.

Si bien el método RT-PCR no es un método estrictamente cuantitativo, en este caso nos sirve para corroborar los datos obtenidos por el análisis cuantitativo Northern y dotarlos de más fuerza si cabe. Además con este método hemos sido capaces de observar un nivel de expresión basal de *RCYI*, invisible para el Northern blot.

Por otra parte, hay que indicar que no se puede descartar un aumento en la estabilidad del mensajero en condiciones de estrés, con lo que disminuiría la degradación del mRNA de *RCYI* durante el choque salino.

4.2.1.3 CINÉTICAS DE LA ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN: PLANTAS EN MACETA Y LARGA DURACIÓN

Con este experimento se pretende comprobar si la expresión de *RCY1* aumenta en proporción a los días de tratamiento con una concentración fija de NaCl (250mM).

Para ello, se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* en maceta, hasta que transcurrieron 10 días, momento en el que se añadió 250mM de NaCl a la solución nutritiva.

Pasados los días indicados en la Figura 22, se extrajo RNA total de plantas tratadas y sin tratar, y se realizó el ensayo Northern. Se utilizó como sonda un RNA marcado radiactivamente por transcripción “in Vitro” utilizando un pBluescript solo con el dominio RS.

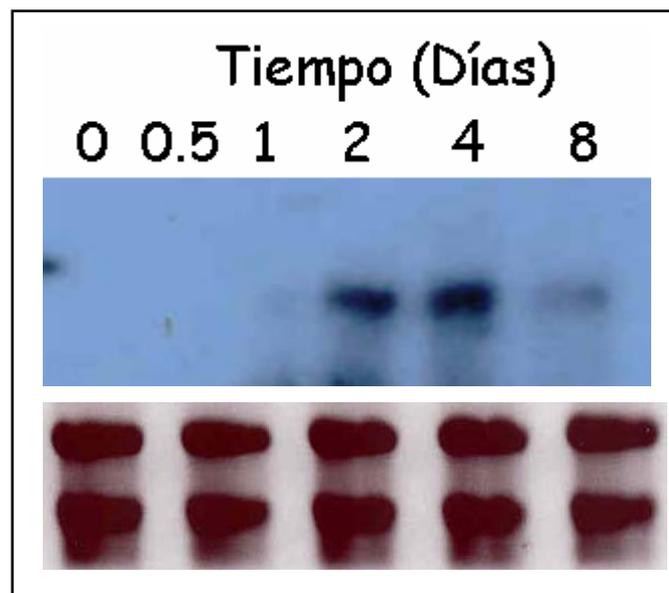


Fig. 22: Cinética de la activación de la expresión de *RCY1*. Análisis Northern de la expresión de *RCY1* durante el tratamiento con NaCl 250mM durante los días indicados en la figura. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA.

La expresión de *RCY1* es máxima a los 4 días después de la adición de la sal. Podemos decir que la sal es una inductora de la expresión de este gen, ya que la señal no aparece hasta prácticamente los dos días después del tratamiento.

Transcurridos ocho días se observa un claro descenso de la señal. Este fenómeno es atribuido al proceso de degradación de RNA, en condiciones salinas, desarrollado anteriormente (Ver apartado 5.3.1.1).

Es importante indicar que se realizó un ensayo Northern control de plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en condiciones normales, y durante el mismo periodo temporal. En ningún momento del ensayo (hasta 8 días), se obtuvo ninguna señal de expresión de *RCY1*.

4.2.1.4 CINÉTICAS DE LA ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN: CULTIVO LÍQUIDO Y CORTA DURACIÓN

Utilizando el método RT-PCR se testó si un tratamiento salino, NaCl y LiCl, inducía la expresión de *RCY1* en un corto periodo de tiempo. Así que, usando también el cultivo líquido de semillas y una concentración fija de sal, añadida después de 15 días de crecimiento, se extrajeron muestras de plantas a distintos periodos de tiempo.

El ensayo se llevó a cabo usando los cebadores RS-F1 y RS-R1.

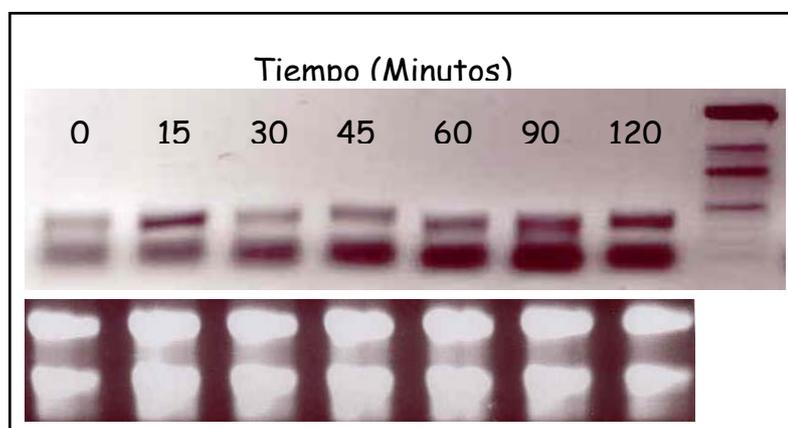


Fig. 23: Cinética de la activación de la expresión de *RCY1*. Análisis RT-PCR de la expresión de *RCY1* al añadir 250mM de NaCl y tomar muestras en los minutos indicados. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

En el caso del NaCl (Figura 23), existe una clara inducción de la expresión a los 15 minutos del tratamiento, descendiendo ésta 15 minutos después, para volver a aumentar transcurridos 60 minutos desde este momento.

De esta figura podemos inferir varios fenómenos:

En primer lugar, existe una expresión basal del gen, aspecto que confirma que aparecen niveles de mRNA sin existir ninguna clase de tratamiento.

También podemos ver como el tratamiento con NaCl induce la expresión de *RCY1*, confirmando datos obtenidos en apartados anteriores.

Por último tenemos un nuevo factor al que referirnos. Se trata de las fluctuaciones temporales provocadas por la adición de la sal. Este aumento y posterior disminución, podría ser provocado por el efecto de degradación de RNA anteriormente nombrado, y una posterior recuperación de la célula, o podría deberse a otro fenómeno. Concretamente, podría ser debido al efecto del ciclo celular en la transcripción. Así, siempre teniendo en cuenta que no hay fluctuaciones en plantas sin tratar (datos no mostrados), podría ocurrir que en la figura 23 estuviéramos observando un sumatorio de señales. En primer lugar el efecto inductorio de la sal en *RCY1*, y un segundo efecto de control de la expresión a cargo de la propia célula y mediado por factores del ciclo celular. Este último efecto no sería debido al dominio ciclina, ya que sin sal no hay fluctuación, sino que serían otros factores del ciclo los encargados de controlar la sobreexpresión del gen. No conocemos cuál es el motivo de este efecto con seguridad, y teniendo en cuenta que podrían existir otras explicaciones, sugerimos estas dos considerándolas las más probables.

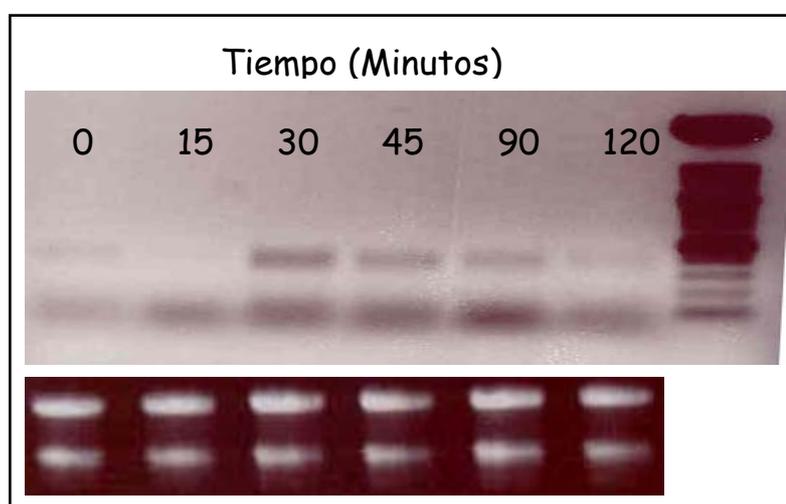


Fig. 24: Cinética de la activación de la expresión de *RCY1*. Análisis RT-PCR de la expresión de *RCY1* al añadir 100mM de LiCl y tomar muestras en los minutos indicados. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

Los resultados obtenidos para el tratamiento con LiCl, fueron similares, si bien se ven con un poco de retraso. Es decir, el máximo se encuentra a los 30 minutos, habiendo un descenso de la expresión menos marcado que en el caso anterior, en los minutos siguientes.

El mínimo se encuentra a 120 minutos, momento en el que en el caso del NaCl, existía otro máximo.

Aunque no se observa si después de 120 minutos existe una recuperación en los niveles de expresión, se mantienen las dos explicaciones desarrolladas anteriormente para explicar este fenómeno.

Para concluir con este apartado, es preciso indicar que existen resultados con similar apariencia cíclica en el laboratorio donde se realiza la presente Tesis. Concretamente el gen SRL1, también implicado en tolerancia a estrés salino, sufre estas fluctuaciones al realizar los mismos experimentos (Datos no mostrados).

Este efecto podría ser sujeto de estudio en futuras investigaciones, que sin embargo se alejan de los objetivos principales del presente trabajo.

4.2.2 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *RCYI* DURANTE TRATAMIENTOS DE ESTRÉS HÍDRICO.

Aunque en levaduras se obtuvo la conclusión de que la sobreexpresión de *RCYI* confiere tolerancia al componente tóxico de la sal (Forment et al., 2002), en plantas puede que esta sobreexpresión cause otro tipo de tolerancias, ya que aunque plantas y levaduras compartan algunas rutas metabólicas y de tolerancia (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Serrano, 1996), otras son totalmente distintas y pueden actuar en este caso.

Es por esto que se decidió testar también, si *RCYI* sufría variaciones de expresión del mRNA en respuesta a otros tipos de estrés y si el resultado obtenido apuntaba positivo, se probaría si dicha sobreexpresión provocaba también tolerancia hacia estos tipos de estrés. El primero y más importante que se escogió fue el estrés hídrico.

Se eligió este estrés porque, combinado a los tratamientos con LiCl, nos permitirá discernir si *RCY1* responde sólo al componente tóxico de la sal (LiCl a concentraciones bajas) o por el contrario, la expresión del gen de estudio responde también a un componente exclusivamente osmótico, en este caso el estrés hídrico.

Sólo se realizó un tipo de experimento para comprobar si el estrés hídrico hacia variar la expresión del gen de estudio. Éste se basaba en un tratamiento de larga duración y en maceta con ausencia total de riego. Hay que reseñar que no se usó un tratamiento a corto plazo, porque este consistía en cultivos líquidos, lo que imposibilita la no adición de riego.

Así, una vez crecidas las plantas durante 10 días, se cesó todo tipo de riego y se fueron tomando muestras de plantas, para su posterior extracción de RNA y análisis Northern con sondas de RNA marcadas radiactivamente a partir de un plásmido pBluescript con sólo el dominio RS clonado.

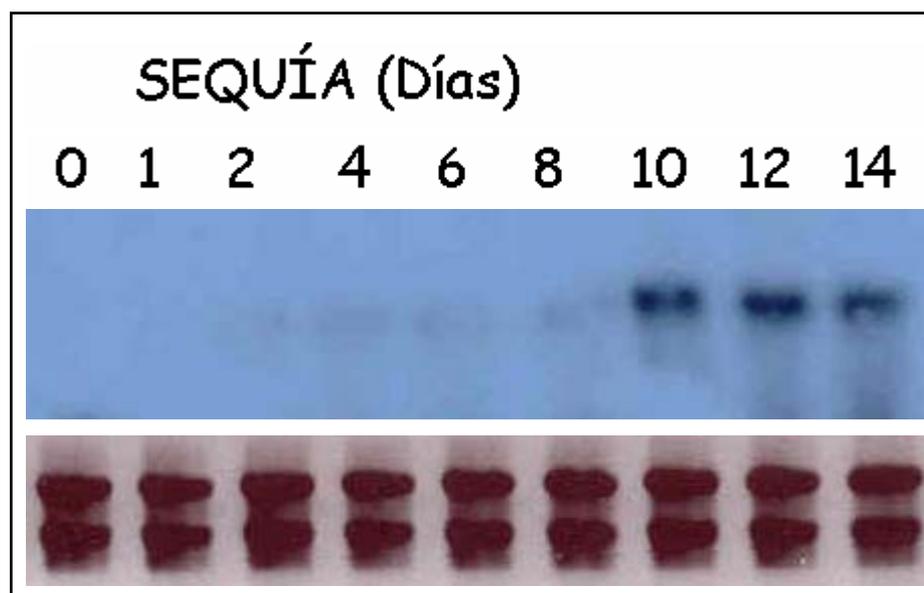


Fig. 25: Inducción de la expresión de *RCY1* durante tratamientos de estrés hídrico. Análisis Northern de la expresión de *RCY1*. Cada calle se corresponde con un número de días después del inicio de la ausencia de riego. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

Como podemos observar en la figura anterior, el estrés hídrico sí provoca una inducción de la expresión del gen. En comparación con el tratamiento con NaCl, podemos observar que la inducción se produce mucho más tarde, aunque esto pueda ser debido a que la tierra no estaba completamente seca.

Este fenómeno puede ser debido a la menor agresividad del estrés hídrico, ya que solo actuaría un componente osmótico, contrastando con el estrés por NaCl, que sumaría a este efecto el componente tóxico y actúa más rápido (Munns, 2002).

Ya que el resultado ha sido positivo, en cuanto al aumento en la expresión de *RCY1* se refiere, se utilizará también el estrés hídrico como una parte importante del trabajo, a la hora de observar que efectos provoca la sobreexpresión del gen de estudio.

Se realizó también un ensayo Northern de plantas sin tratar durante 24 días después de la siembra, y en ningún momento se detectó señal de expresión de *RCY1* (datos no mostrados).

4.2.3 EXPRESIÓN DE *RCY1* DURANTE OTROS TRATAMIENTOS ESTRESANTES Y FITOQUÍMICOS

Al igual que lo ocurrido en el caso del estrés hídrico, podría ocurrir que otros tratamientos farmacológicos, incluyendo tratamientos hormonales u otros estreses, alteraran la expresión del gen de estudio. Esto sería un indicio que nos permitiría conocer con mayor precisión las rutas de tolerancia en las que actúa *RCY1*. Es decir si este gen viera alterada su expresión después de un tratamiento hormonal concreto, puede que esta hormona esté relacionada con el mecanismo de tolerancia, y aunque esto no sería probatorio, si sería un buen punto de partida.

Para comprobar dicha hipótesis de trabajo, se realizaron tratamientos tanto de corta, como de larga duración:

4.2.3.1 TRATAMIENTOS EN MACETA Y DE LARGA DURACIÓN

Se realizaron en maceta, y consistieron en sembrar las semillas, y pasados 15 días añadir al agua de riego los siguientes productos fitoquímicos: etefón 100 μ M, Ácido salicílico 100 μ M, Ácido Abscísico 100 μ M, Ácido Jasmónico 50 μ M, Sorbitol 400mM y peróxido de hidrógeno 100 μ M (Lawson et al., 1994; Naranjo et al., 2006). Asimismo, también se realizó un tratamiento en el que se introdujo una maceta 12 horas a 4°C y otro de 12 horas a 37°C.

Transcurridas 24 horas desde el inicio del tratamiento, se extrajo el RNA y se realizó un ensayo Northern para comprobar los niveles de expresión con respecto a una planta sin tratar (Control). Las sondas usadas fueron de RNA, marcadas radiactivamente como en el experimento de la Fig. 19

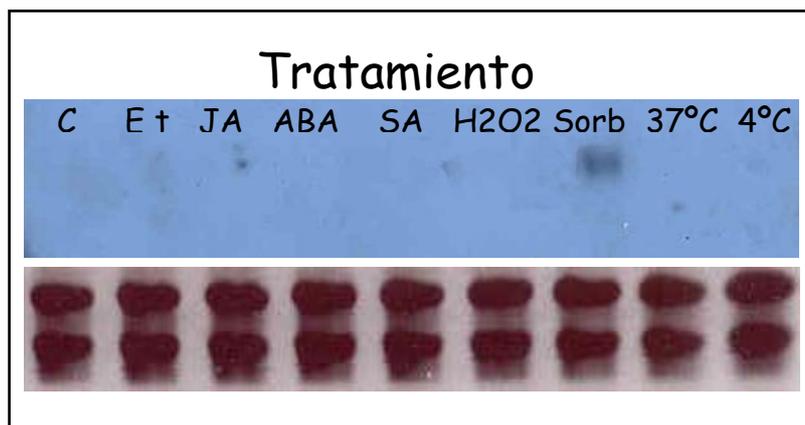


Fig. 26: Inducción de la expresión de *RCY1* durante tratamientos fitohormonales y estresantes. Análisis Northern de la expresión de *RCY1* después de tratamientos durante 24 h de las sustancias indicadas bajo cada calle. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

El único tratamiento que en el que observamos una clara inducción es el producido por sorbitol. Los demás tratamientos no logran alterar la expresión, o al menos no se logra detectar en este ensayo. Es por esto que se decidió utilizar el tratamiento con RT-PCR, que aunque no es del todo cuantitativo, si es mucho más sensible que el Northern.

Hay que indicar que la aparición de señal en el caso del sorbitol, es un indicio más, al igual que el estrés hídrico, que apunta que *RCY1* también puede estar relacionado con la respuesta al componente osmótico de la sal, ya que el sorbitol al hallarse en una concentración elevada, crea un potencial osmótico en el exterior celular, que impide la entrada a las partículas de agua, provocando plasmólisis y por tanto estrés hídrico.

4.2.3.2 TRATAMIENTOS EN CULTIVO LÍQUIDO Y DE CORTA DURACIÓN

En este caso, para realizar los tratamientos se utilizó un medio de cultivo líquido. Con este método se pretende que la sustancia añadida entre en contacto más rápido con la planta, para poder medir la variación de la expresión de *RCY1* en un tiempo menor. Adicionalmente se combinó este método de cultivo con la RT-PCR, para poder obtener así, una mayor sensibilidad.

Por tanto, se sembraron semillas en este medio de cultivo, y a los 15 días se añadieron las siguientes sustancias farmacológicas, pero esta vez durante sólo 1 hora: etefón 100µM, Ácido salicílico 100µM, Ácido Abscísico 100µM, Ácido Jasmónico 50µM, Sorbitol

400mM y peróxido de hidrógeno 100µM. También se realizó un tratamiento en el que se introdujo el matraz 1 hora a 4°C y otro de 1 hora a 37°C.

Posteriormente y siguiendo el procedimiento habitual, se extrajo RNA y se realizó la RT-PCR a 26 ciclos. El ensayo se llevó a cabo usando los cebadores RS-F1 y RS-R1, y con 0.5µg de RNA total.

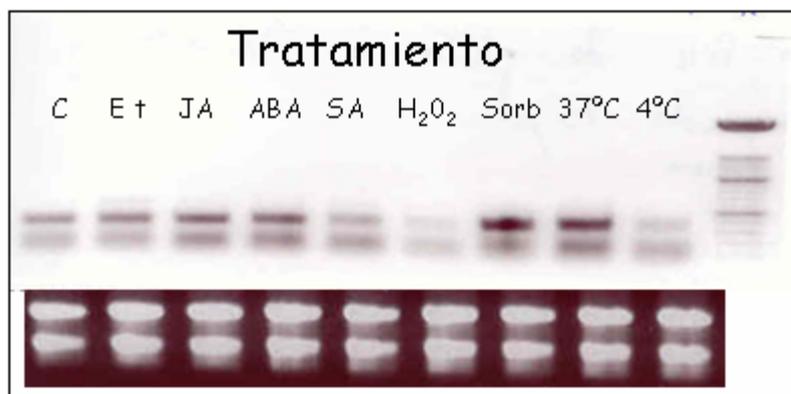


Fig. 27: Inducción de la expresión de RCY1 durante tratamientos fitohormonales y estresantes. Análisis RT-PCR de la expresión de RCY1, después de tratamientos con distintas hormonas y agentes estresantes. Los tratamientos fueron realizados en cultivo líquido y con una duración de 1 hora y con 100µM Etefón (Et), 50µM Ácido Jasmónico (JA), 100µM Ácido Abscísico (ABA), 100µM Ácido Salicílico (SA), 100µM H₂O₂, 0.4M Sorbitol (Sorb) y dos tratamientos a la temperatura indicada. El no tratamiento se marca con la letra C. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

En este caso sí podemos observar un nivel de expresión basal (Ver Figura 27), no mostrado en el Northern. También observamos que ningún tratamiento hormonal consigue disparar significativamente la expresión de *RCY1*. Donde sí existe variación, confirmando los datos del apartado anterior, es en el caso del sorbitol, que corrobora aún más la hipótesis de la participación de *RCY1* en el mecanismo de reacción al componente osmótico de la sal.

También podemos observar otros datos interesantes que no aparecen en el caso del análisis Northern, siendo achacada esta circunstancia a la mayor sensibilidad del método RT-PCR.

A 37°C se detecta una inducción, dato en contraste con la menor expresión del gen a 4°C. El estrés por choque térmico está relacionado en muchos de sus mecanismos, con el estrés por choque osmótico, ya que durante el periodo a temperatura elevada, la célula vegetal sufre una desecación, que activa los mecanismos para responder a choque osmótico

(Zhu, 2001). Así pues, este dato de aumento de la expresión a 37°C viene a confirmar que *RCY1* responde tanto al componente tóxico, como al componente osmótico de la sal

Hay que destacar también la disminución de la señal en el caso del tratamiento con peróxido de hidrógeno. En principio este dato no sería lógico, ya que durante el estrés salino e hídrico, se generan numerosas especies reactivas del oxígeno (ROS) (Zhu, 2001). Estas ROS, causan un gran daño celular, pero no son los primeros daños que ocurren en la célula, pudiendo ocurrir que *RCY1* sea una de los primeros genes que se expresa en presencia de sal, pero en pasos posteriores del estrés no se exprese. Es decir, al añadir una sal al medio, se producen primero una serie de daños en la célula, tales como la inhibición enzimática o la desnaturalización de los ácidos nucleicos. Posteriormente es cuando aparecen las ROS, y puede que en este punto, *RCY1* ya haya cumplido su función.

En resumen, todos estos datos de la expresión de *RCY1*, nos sirven para poder predecir cual será su acción en la célula estresada, y cuales pueden ser los estreses a los que este gen responda de forma natural. También nos podría haber indicado si puede que haya alguna ruta hormonal mediando en el proceso, aunque por ahora el resultado es negativo, aunque no definitivo.

4.2.4 EXPRESIÓN TOPOGRÁFICA DE *RCY1*

Otro dato importante que nos puede revelar este tipo de experimentos de expresión génica es, en qué órganos de la planta se expresa con mayor o menor intensidad el gen de estudio.

Por tanto, se tratará de extraer RNA de diferentes órganos de la planta y compararlos por separado con una mezcla de RNA, a la misma concentración, de los diferentes órganos.

Hay que indicar que como al utilizar el método Northern para medir esta expresión, no es posible detectar nivel basal de *RCY1*, no sería lógico entonces, realizar el experimento utilizando dicha técnica, ya que el resultado sería inexistente.

Es por esto que la técnica a usar será la RT-PCR, que al ser de corte semicuantitativo, tendrá que ser corroborada por otras técnicas que se expondrán posteriormente.

Así pues, se separaron los diferentes órganos de plantas crecidas en maceta durante 22 días, extrayéndose posteriormente el RNA y realizándose el ensayo RT-PCR usando

como cebadores RS-F1 y RS-R1. La reacción se llevó a cabo en 32 ciclos y con una cantidad de RNA de 0.5µg. El RNA usado fue el propio para cada órgano, y en el caso del control, el RNA usado fue la mezcla de 0.1µg del RNA de cada muestra.

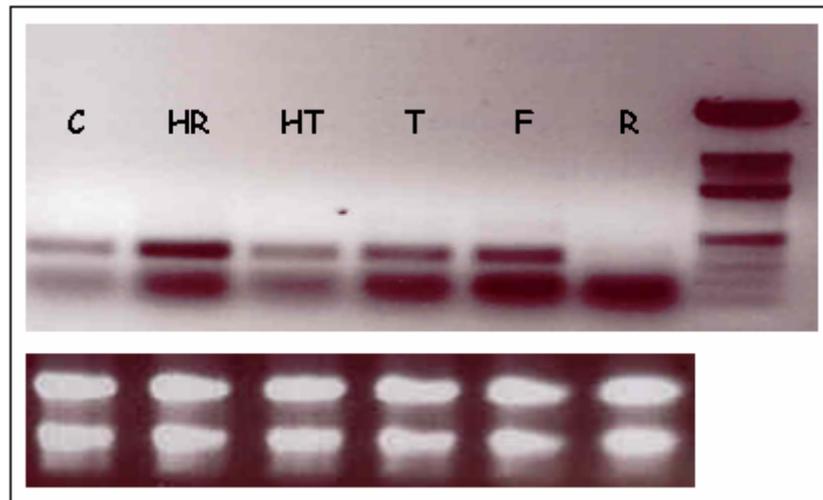


Fig. 28: Expresión topográfica de *RCY1*. Análisis RT-PCR de los diferentes órganos de la planta: Hojas de roseta (HR), Hojas de tallo (HT), Tallo (T), Flor (F), Raíz (R) y mezcla equimolar (C). En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA (bandas de rRNA en el gel, teñidas con Bromuro de Etidio).

Observando la figura 28, podemos distribuir los órganos de la planta en tres grupos, según el nivel de expresión de *RCY1*. En primer lugar, un grupo en los que la expresión del gen de estudio es mayor que la de la mezcla control, hojas de roseta y flores. En segundo lugar los órganos en los que la expresión es similar, tallo y hojas de tallo. Por último observamos que la expresión en raíces es casi inexistente.

Como se ha indicado anteriormente, este método es indicativo de la expresión, y no es usado de forma concluyente. Para poder confirmar estos datos y poder concretar con rotundidad el lugar de expresión de *RCY1*, se realizaron una serie de experimentos desarrollados en el apartado siguiente.

4.3 ANÁLISIS DEL PROMOTOR DE RCY1 MEDIANTE GENES TESTIGO

Para la obtención de un patrón topográfico de expresión del gen de estudio se decidió realizar este abordaje en plantas transgénicas, en el que el promotor de *RCY1* se fusiona a genes testigo como el GUS, que nos darán una señal visible, si dicho promotor se está expresando.

Con este método no sólo podremos observar en que tejidos se expresa nuestro gen, sino que podremos someter a las plantas tratadas, a distintos tratamientos estresante, y comprobar así si el promotor responde a estos estímulos.

4.3.1 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DEL GEN *RCY1*.

Este gen *GUS* codifica la β -glucuronidasa de *Escherichia coli*, una enzima capaz de transformar el sustrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide en una sustancia de coloración azul, visible a simple vista. Por tanto, si el promotor actúa transcribiendo este gen, se formará la β -glucuronidasa, y al añadir el sustrato específico, obtendremos coloración azulada en los tejidos de transcripción activa para dicho promotor (Jefferson et al., 1987).

Para realizar la fusión, primero se amplificó por PCR el fragmento correspondiente al promotor. Utilizando la base de datos TAIR, en la que se puede encontrar el genoma de *Arabidopsis thaliana* secuenciado por completo, se diseñaron unos cebadores cuyo inicio era el sitio +1 aguas arriba del gen y su final el lugar +1000 también aguas arriba. Así, con esta longitud tendríamos cubiertas todas las secuencias promotoras en sentido estricto, tales como las cajas TATA que se localizan normalmente cerca del inicio del promotor, además de otros posibles elementos en cis. Podría darse el caso de la existencia de estos elementos mas allá de los 1000 pares de bases, pero la probabilidad de que esto ocurriera no compensaría el hecho de trabajar con un inserto mayor, factor que dificultaría más el proceso de clonación.

Estos cebadores diseñados fueron nombrados como PromRCY1-F1 y PromRCY1-R1, y contenían en sus secuencias los sitios de restricción NcoI y SalI respectivamente, lo que facilitará su posterior inserción en el plásmido escogido. Este plásmido es el pBI121 que

posee dichos sitios de restricción en el lugar de policlonación, además de poseer la secuencia GUS preparada para quedar adyacente al promotor elegido.

Así pues se procedió a la amplificación por PCR del promotor y se siguió el protocolo de clonación por enzimas de restricción.

Una vez purificado el plásmido con inserto y comprobado por PCR, que el inserto era el correcto, se procedió a la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y posteriormente a la de *Arabidopsis thaliana* obteniéndose un total de 10 líneas homocigotas independientes.

El siguiente paso a realizar era el de comprobar si había actividad GUS en alguna parte de la planta y sin ningún tipo de tratamiento. Para eso, se seleccionaron plantas adultas poseedoras de todos los tejidos y se procedió al tratamiento con el sustrato específico, y posterior revelado.

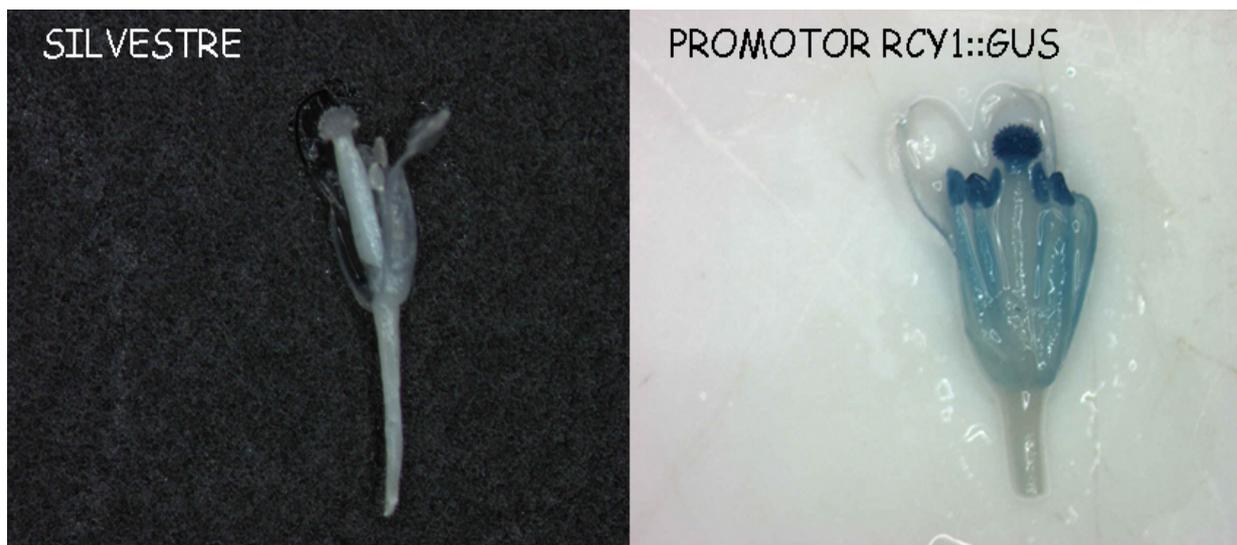


Fig. 29: Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa bajo el control del promotor del gen *RCY1*. Detección de actividad glucuronidasa en flores de *Arabidopsis thaliana*, 2 días después de la antesis. Se compara la expresión de plantas no transformadas (Silvestre) con las transformadas con el gen *GUS* bajo el control del promotor de *RCY1*.

El resultado fue que sólo encontrábamos expresión del promotor en el estigma, estilo, polen, estambre y parte del filamento, aunque puede que este venga por difusión (Ver figura 29). En el resto de estructuras analizadas nunca apareció coloración azul, a excepción de un porcentaje aproximadamente del 5% de las hojas, que presentaban una leve coloración en comparación al resto de hojas y al silvestre (Ver figura 30).

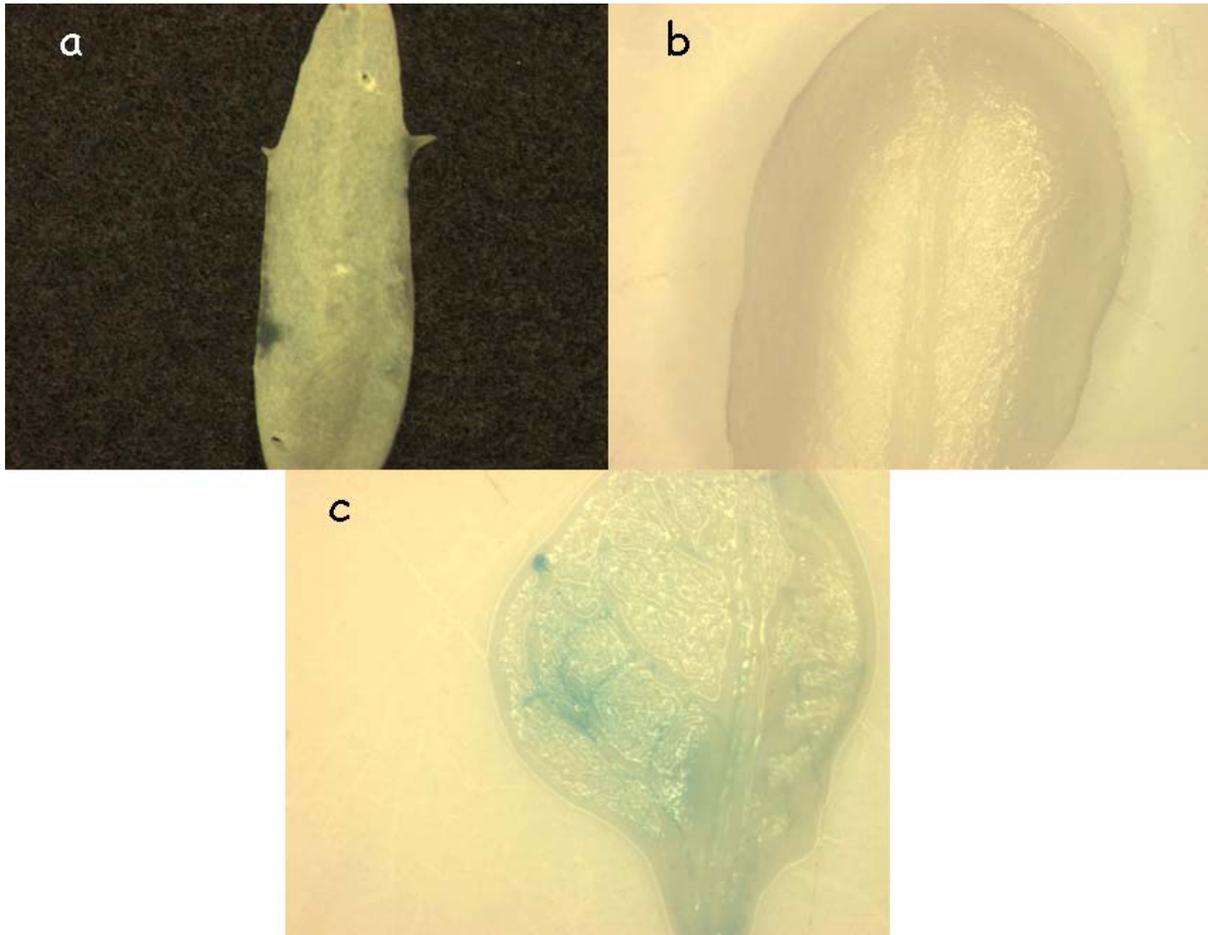


Fig. 30: Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa bajo el control del promotor del gen *RCY1*. Expresión del gen GUS bajo el promotor de *RCY1* en hojas de plantas silvestre (no transformada) (a), 95% de las hojas de la transgénica Promotor *RCY1*::GUS (b) y 5% de las hojas de la misma transgénica (c).

También se puede observar que antes de la antesis, sólo aparece la expresión del gen testigo GUS en el estigma (Ver figura 31), aunque en menor medida que después de este proceso (Ver figura 29). Se puede decir por tanto que el promotor de *RCY1* provoca expresión en etapas tardías de la formación del estambre y polen, y aparece en etapas tempranas del estigma, pero aumenta mucho su expresión en etapas posteriores.



Fig. 31: Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa bajo el control del promotor del gen *RCY1*. Expresión de GUS bajo el promotor *RCY1* en flores preantésicas.

Gracias a todos estos datos, podemos afirmar que el promotor de *RCY1* provoca que los genes que estén bajo su dominio, se expresen casi exclusivamente en estructuras en donde es importante que aparezca un proceso de desecación sin muerte celular, como el polen, que aunque es fértil aun estando hidratado, sufre un proceso profundo de deshidratación, que le permitirá entre otros aspectos sobrevivir más tiempo fuera de la planta, al igual que le permitirá a la planta poder controlar su germinación en caso de compatibilidad. En el caso de la antera, ocurre algo similar. Para que ésta pueda sufrir correctamente el proceso de dehiscencia, y por tanto formar polen maduro y viable se necesita que sufra un proceso de desecación, circunstancia que no ocurre por ejemplo en los mutantes *dad1*, carentes de una lipasa A1 encargada de formar ácido jasmónico e incapaces de desecar la antera (Ishiguro et al., 2001), no formándose polen viable.

Por último, también es importante añadir que en el estigma también se produce un proceso de desecación y posterior recuperación de la hidratación, necesaria para la germinación del polen desecado. En algunas especies, siendo este el caso de *Arabidopsis thaliana*, el estigma se deseca, y si el polen es compatible, se produce una humidificación del propio estigma, que causa la germinación del gametófito masculino. Se cree que este proceso de desecación es ABA dependiente, aunque el proceso no es aún conocido (Kovaleva and Zakhlova, 2003).

El porcentaje de hojas con expresión GUS (5%), ha sido achacado a la posibilidad de que estas hojas estén sufriendo algún tipo de estrés osmótico. En este sentido, hay que indicar que la expresión se observa en los haces vasculares. Teniendo en cuenta los Northern digitales (Ver apartado 5.9.1), puede que esta expresión se localice en los vasos xilemáticos.

También es importante señalar que no se detectó actividad GUS en otra estructura que sufre un proceso de deshidratación, como es la semilla (Ver figura 32).



Fig. 32: Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa bajo el control del promotor del gen *RCYI*. Actividad Gus en semillas de plantas Prom *RCYI::GUS*

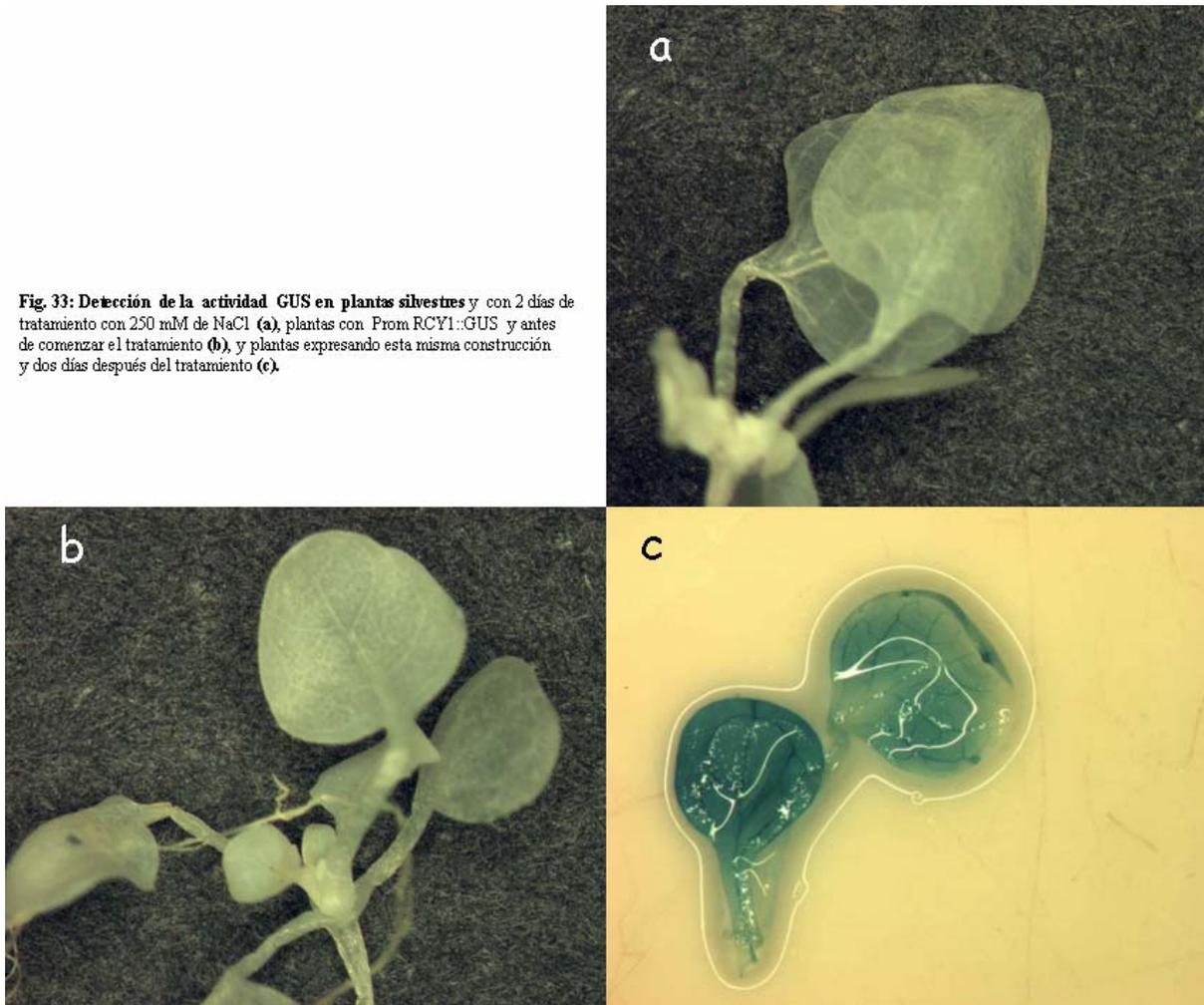
4.3.1.1 EXPRESIÓN DEL PROMOTOR EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

Las plantas poseedoras de la fusión Prom *RCYI::GUS*, fueron sometidas a tratamientos con NaCl 250mM, para observar si el promotor aumenta su actividad en estas condiciones. Se utilizaron plantas de 7 días, y los ensayos se realizaron en maceta. Después se reveló la presencia de actividad GUS.

El resultado obtenido fue claro, las plantas con dicha fusión expresaban el GUS de manera clara a los 2 días de comenzar el tratamiento (Ver figura 33), observándose el gen

testigo en todos los órganos visibles, siendo especial su presencia en las raíces debido a la gran intensidad obtenida.

Fig. 33: Detección de la actividad GUS en plantas silvestres y con 2 días de tratamiento con 250 mM de NaCl (a), plantas con Prom RCY1::GUS y antes de comenzar el tratamiento (b), y plantas expresando esta misma construcción y dos días después del tratamiento (c).



Por tanto, el promotor de RCY1 es un promotor que promueve la expresión en condiciones de estrés salino.

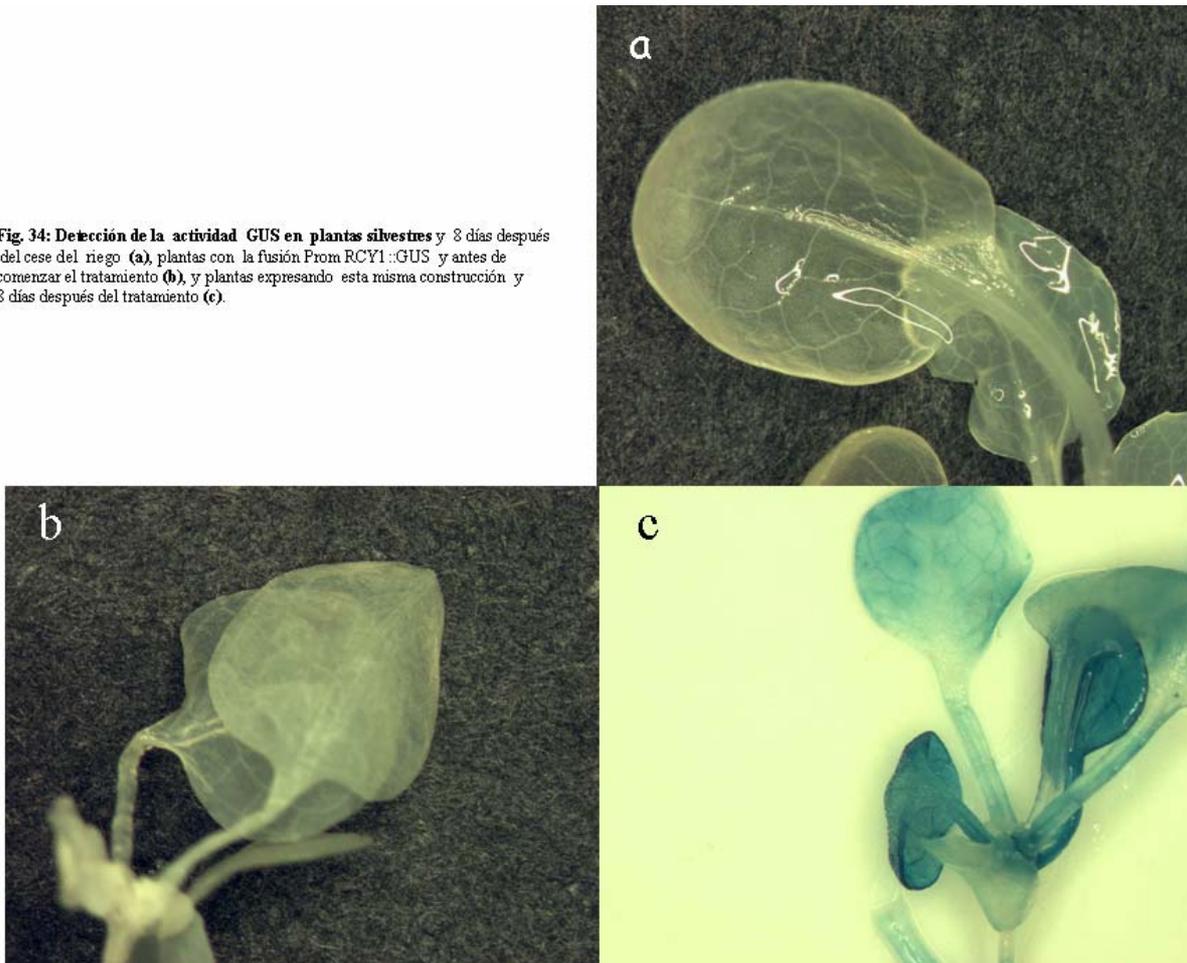
4.3.1.2 EXPRESIÓN DEL PROMOTOR EN CONDICIONES DE SEQUÍA

Se realizó un experimento similar al apartado anterior, en el que plantas sembradas en maceta se dejaron de regar a partir del día 7º después de su germinación. Posteriormente, se reveló la presencia de actividad glucuronidasa cada 24 horas.

En esta ocasión el resultado también es claro, pero hay que esperar al 8º día después del cese del riego para observar expresión GUS. En este caso hay que tener en cuenta que el estrés no se produce en el mismo instante de la ausencia de riego, como ocurre en el caso del

NaCl, sino que deben pasar una serie de días hasta que la tierra humedecida se seca y comienza el estrés.

Fig. 34: Detección de la actividad GUS en plantas silvestres y 8 días después del cese del riego (a), plantas con la fusión Prom RCY1 ::GUS y antes de comenzar el tratamiento (b), y plantas expresando esta misma construcción y 8 días después del tratamiento (c).



Con todos estos datos, se puede decir que este promotor, también promueve la síntesis de RNA en condiciones de estrés por sequía.

4.4 ANÁLISIS FUNCIONAL DE *RCYI* POR SOBREEXPRESIÓN EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*

Después de haber comprobado que la sobreexpresión de este gen otorga tolerancia a NaCl y LiCl en *Saccharomyces cerevisiae* (Forment et al., 2002), se intentó demostrar, si este gen de *Arabidopsis thaliana*, confiere tolerancia a estas mismas sales en la planta de donde proviene, cuando se sobreexpresa.

Gracias al trabajo previo en nuestro laboratorio del Dr. Miguel Ángel naranjo se realizó una construcción en el plásmido pBI121, al que previamente se le había eliminado el gen de la glucuronidasa. Así, el vector sirvió para fusionar el gen *RCYI* con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, que una vez introducido en *Arabidopsis thaliana*, provocaría la sobreexpresión del gen adyacente, en este caso el gen *RCYI*.

Este vector, primero se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens*, utilizándose después el método de infiltración en planta para transformar *Arabidopsis thaliana*. Es en este punto donde empieza el trabajo de este doctorando, al seleccionar las líneas transformadas con dicha construcción.

Se obtuvo un total de 15 líneas transformadas independientes, de las cuales 8 fueron seleccionadas 4 generaciones más tarde como homocigotas, y con sólo una copia del gen, ya que cumplían la segregación mendeliana correctamente, utilizando la kanamicina como marcador de selección, ya que es la que posee el plásmido usado.

Se comprobó que las líneas homocigotas expresaban el gen por medio de un ensayo Northern (Datos no mostrados).

Se realizaron tratamientos en todas las líneas transgénicas, pero se escogió al azar la línea transgénica 3 para los siguientes tratamientos, comprobándose que visualmente, el resto de las líneas tenían un comportamiento similar:

4.4.1 TOLERANCIA A NaCl

Antes de comenzar, se observó que en condiciones de ausencia de sal, el crecimiento de las líneas transgénicas es idéntico al de las plantas silvestres, descartándose así la hipótesis de un mayor vigor general de las plantas transgénicas. Esto se puede comprobar en la figura 35 que se representa a continuación.

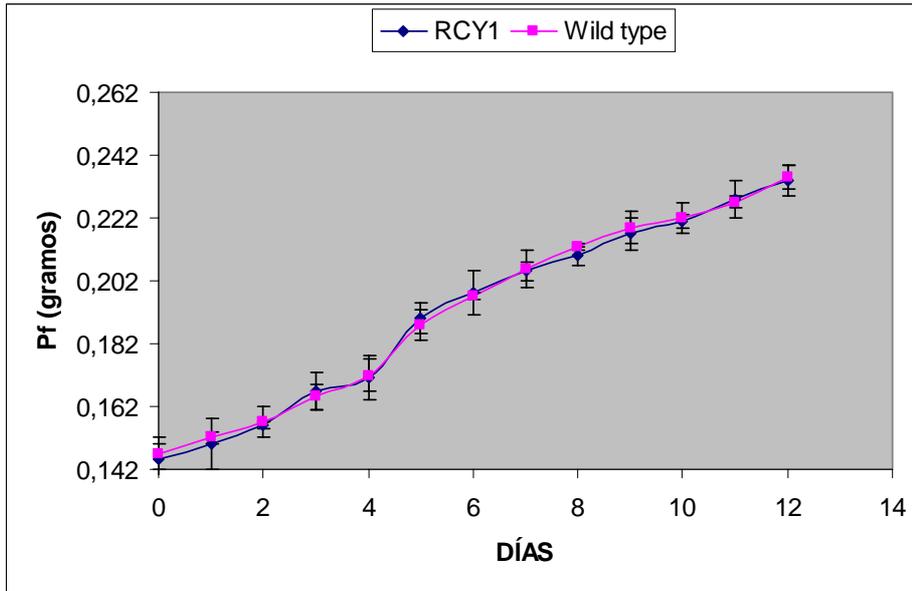


Fig. 35: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Representación gráfica del peso fresco (Pf) con respecto a los días de cultivo, de plantas sobreexpresando RCY1 y silvestres, teniendo en cuenta que el día 0 es el día 15 después de la siembra.

Después, se sembraron las semillas homocigotas, junto con plantas silvestres, en macetas, y se añadió a la solución nutritiva NaCl 250mM, una vez transcurridos 15 días desde su siembra. Siete días después de iniciado el tratamiento se puede observar (Ver Figuras 36 y 37) que las plantas transgénicas (Nombradas como Línea 3 y 4) tienen un desarrollo floral prácticamente normal. En cambio, las plantas silvestres no son capaces de desarrollar el tallo floral debido al estrés causado por el riego con NaCl.



Fig. 36: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Tratamiento con NaCl 250mM en plantas transgénicas sobreexpresando RCY1, comparado con plantas silvestres (control). Todas las plantas se crecieron durante 15 días, momento en el que a la solución nutritiva se le añadió 250 mM de NaCl, hasta 7 días después cuando se tomó esta foto.



Fig. 37: Análisis funcional de RCY1 por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Tratamiento con NaCl 250mM en plantas transgénicas sobreexpresando RCY1, comparado con plantas silvestres (control). Todas las plantas se crecieron durante 15 días, momento en el que a la solución nutritiva se le añadió 250 mM de NaCl, hasta 7 días después cuando se tomó esta foto.

El 90% de las plantas transgénicas sometidas a tratamiento lograban desarrollarse por completo, contrastando con el 3% de las silvestres.

Pero no sólo se podía observar una diferencia en el desarrollo reproductor. También se midieron una serie de parámetros que ratifican la tolerancia a NaCl de las líneas transgénicas con respecto a los controles. De esta forma, se diseñó un bioensayo consistente en el tratamiento de las plantas crecidas durante 15 días después de la siembra, con NaCl 250mM. Así, después de este periodo previo de crecimiento, se añadió la sal a la solución nutritiva y se recolectaron 50 plantas distintas cada día. Los resultados son mostrados de forma gráfica en las figuras 38 y 39:

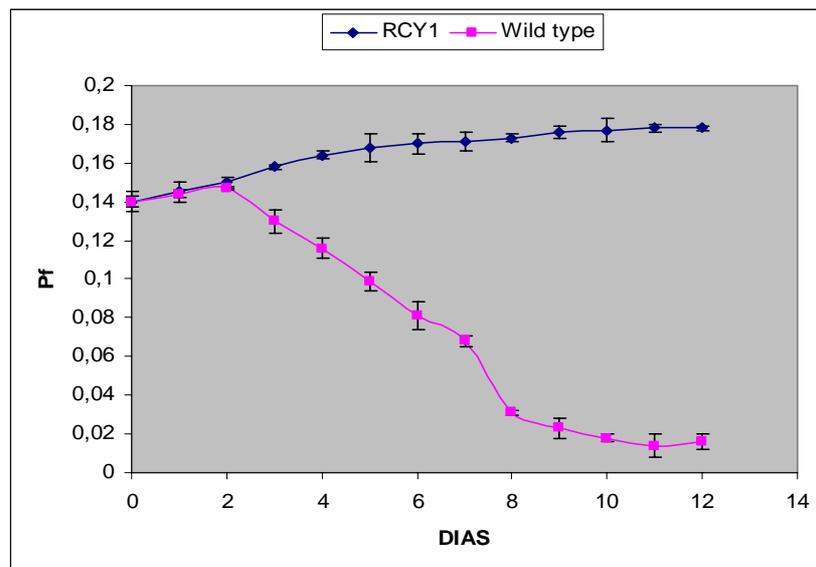


Fig. 38: Análisis funcional de RCY1 por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Representación de los valores medios del peso fresco (Pf) de 50 plantas recogidas cada día durante 12. Las semillas se sembraron y 15 días después (Día 0 del gráfico) comenzó el tratamiento con 250mM de NaCl.

En este gráfico podemos observar como tanto las plantas transgénicas, como las silvestres, crecen de manera similar durante 2 días, después de iniciar el tratamiento. Transcurrido este periodo, podemos observar el descenso brusco de peso fresco que sufre las plantas silvestres, que comienza a deshidratarse por la acción del NaCl. En contraste, se puede observar que la línea transgénica sobreexpresando RCY1 sigue paulatinamente aumentando en peso, eso si, sufriendo un descenso en la tasa de crecimiento conforme pasan los días.

Así, podemos decir que en 10 días una planta silvestres de *Arabidopsis thaliana*, pierde el 90% de su peso fresco, en condiciones de NaCl 250mM en la solución nutritiva. Por el contrario, las plantas transgénicas no solo no sufren un descenso de su peso, sino que lo aumentan aproximadamente un 20%, hecho que les permite desarrollar las partes reproductoras de manera casi normal, como se puede observar en las figuras 36 y 37.

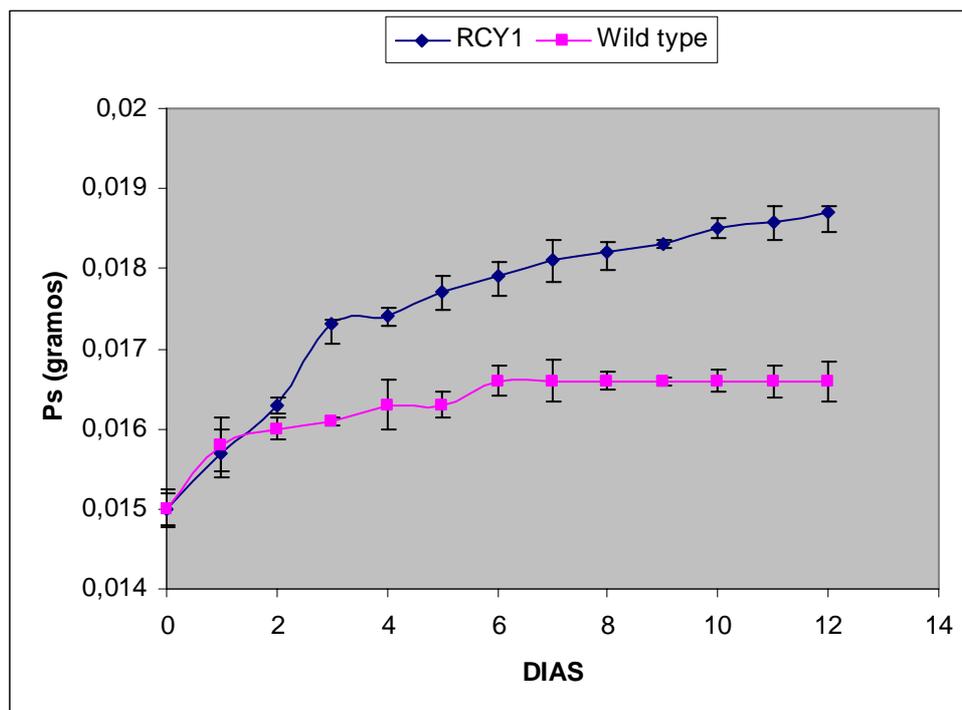


Fig. 39: Análisis funcional de RCY1 por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Representación de los valores medios del peso seco (Ps) de 50 plantas recogidas cada día durante 12. Las semillas se sembraron y 15 días después (Día 0 del gráfico) comenzó el tratamiento con 250mM de NaCl.

El gráfico anterior nos permite separar entre hidratación y crecimiento. Es decir, en el gráfico de la figura 38 podíamos cometer el error de confundir un aumento del agua en las plantas transgénicas, con un aumento en el crecimiento, y por tanto, mayor tolerancia, pero en este gráfico se mide la planta después de haber sido secada a 42°C durante 12 horas para

eliminar todo resto de agua. De esta forma nos aseguramos que todo el aumento de peso es debido a crecimiento.

En este gráfico se observa como el crecimiento de la planta transgénica es constante, aunque transcurre de forma más lenta a partir del cuarto día. Por el contrario, el crecimiento de la planta silvestre solo puede compararse con el de la transgénica el primer día, posteriormente crece de forma muy lenta, hasta que aproximadamente en el sexto día cesa. Así, comparando las dos curvas deducimos que las plantas transgénicas toleran de forma mas eficaz el NaCl que las silvestres.

4.4.2 TOLERANCIA A SEQUÍA

Antes de comenzar, hay que indicar que el crecimiento de las plantas transgénicas sobreexpresando *RCY1* es igual al de las plantas silvestres en condiciones normales de riego y durante 30 días (Ver figura 40)

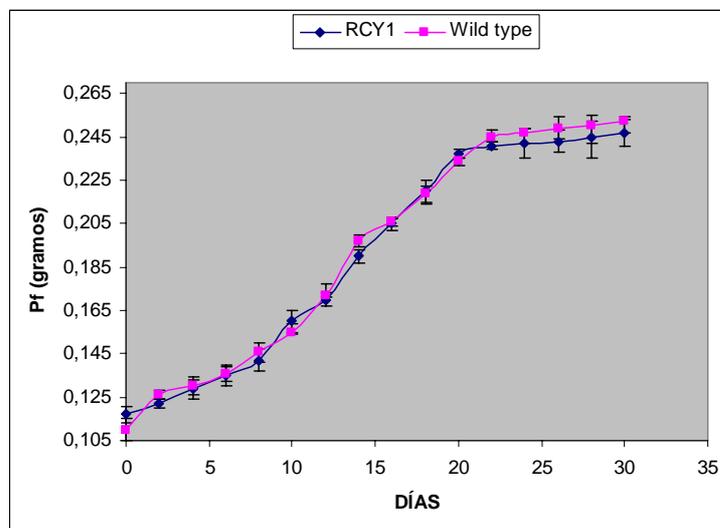


Fig. 40: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Representación de la variación del peso fresco en 30 días, de plantas silvestres y transgénicas. El día 0 es el séptimo después de la siembra.

Después, se sembraron las semillas homocigotas (sobreexpresando el gen *RCY1*), junto con plantas silvestres, en macetas. Una vez transcurridos 10 días desde la siembra, se dejó de regar totalmente el cultivo y se esperó 12 días más hasta tomar las fotos de las figuras 41 y 42:

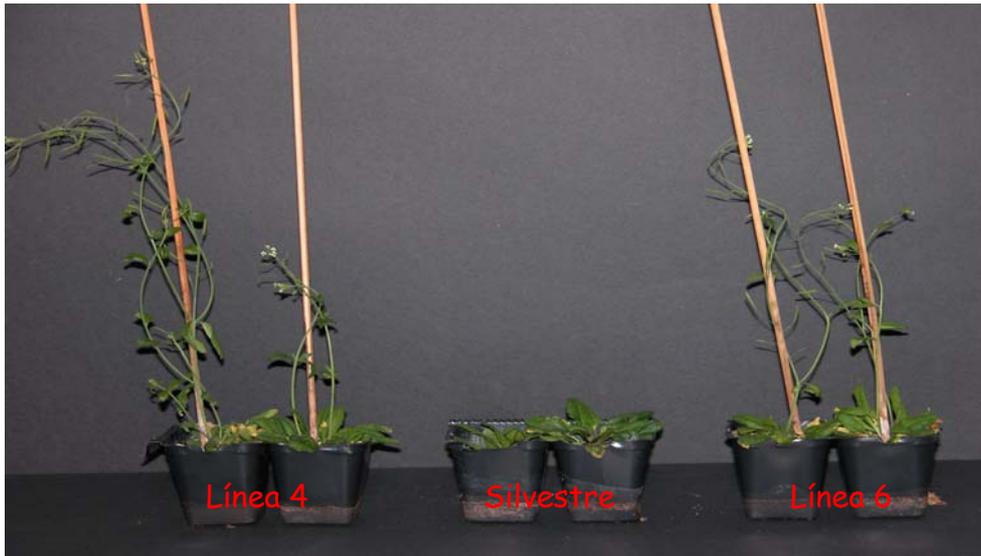


Fig. 41: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Tratamiento de ausencia de riego en plantas transgénicas sobreexpresando *RCY1*, comparado con líneas silvestres (control). Todas las líneas se crecieron durante 10 días, momento en el que ya no se suministró más solución nutritiva, hasta 12 días después, cuando se tomó esta foto.



Fig. 42: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Tratamiento de ausencia de riego en plantas transgénicas sobreexpresando *RCY1*, comparado con líneas silvestres (control). Todas las líneas se crecieron durante 10 días, momento en el que ya no se suministró más solución nutritiva, hasta 12 días después, cuando se tomó esta foto.

Las líneas transgénicas (3, 4, 5 y 6), consiguen desarrollarse de forma normal, mientras que las plantas silvestres ni siquiera son capaces de desarrollar el tallo floral para poder reproducirse. En el caso de estrés por sequía, el 100% de las plantas transgénicas desarrollan el tallo floral, contrastando este dato con sólo el 7% de las plantas silvestres, siendo el tallo reproductivo de estas últimas siempre de menor tamaño.

Como se muestra en el apartado de estrés salino, en este caso también se ha considerado el peso fresco y seco para poder valorar la tolerancia. Como sucediera en el caso

anterior, los gráficos representando estos parámetros demuestran la tolerancia mediada por *RCY1*.

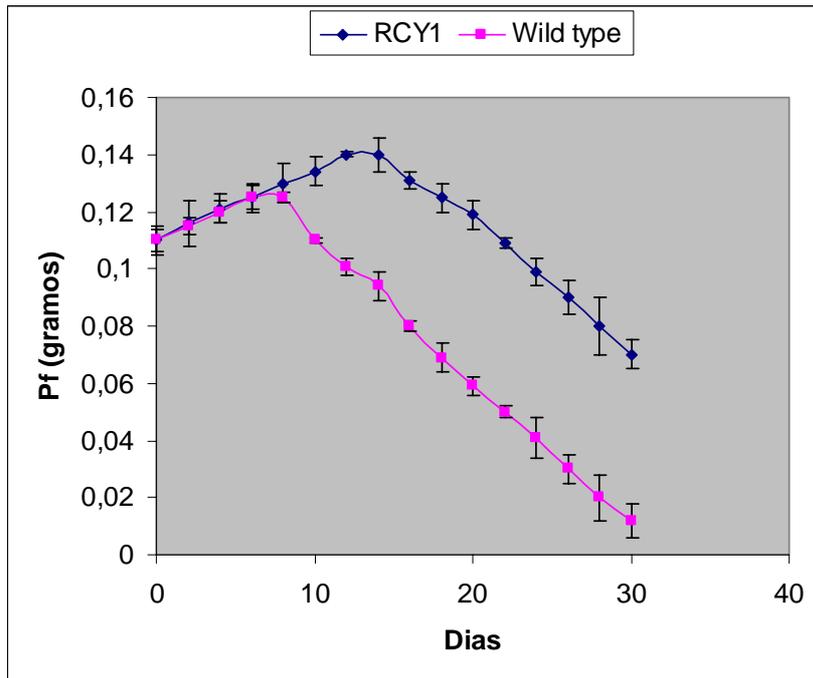


Fig. 43: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Representación de los valores medios del peso fresco de 50 plantas recogidas cada 2 días durante 30. Las semillas se sembraron y 7 días después (Día 0 del gráfico) comenzó el tratamiento al dejar de regar.

Como se puede observar en este gráfico, el peso fresco de las plantas transgénicas, sobreexpresando *RCY1*, aumenta aproximadamente durante 5 días más que en las plantas silvestres. Esto implica que la planta sigue hidratada durante un periodo más largo de tiempo, por lo que su crecimiento será más parecido a una situación de riego normal.

También podemos observar que la posterior deshidratación es levemente menor en las plantas transgénicas, debido a que la pendiente descendente del gráfico es menor. Esto también corrobora el efecto de tolerancia a estrés hídrico que provoca el gen *RCY1* sobreexpresado.

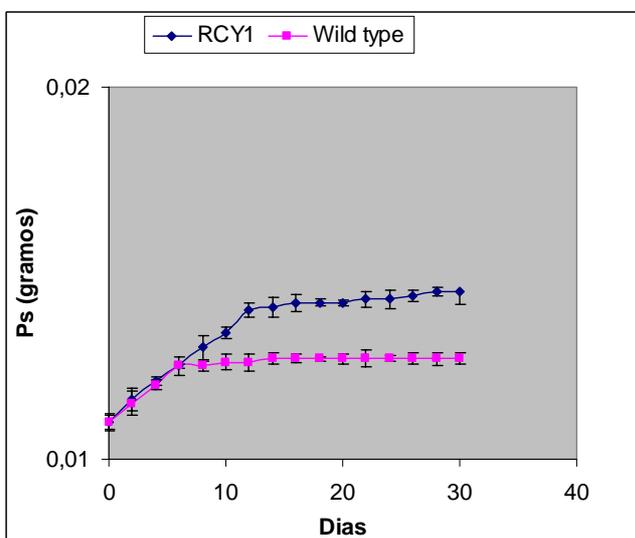


Fig. 44: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Representación de los valores medios del peso seco de 50 plantas recogidas cada 2 días durante 30. Las semillas se sembraron y 7 días después (Día 0 del gráfico) comenzó el tratamiento al dejar de regar.

De esta manera, y al observar el gráfico, podemos observar que en las plantas transgénicas se producen 2 etapas de crecimiento, una rápida (1 a 12 días) y una lenta (12 a 30 días), pero lo que es más importante la planta nunca cesa su crecimiento. Por el contrario, las plantas silvestres crecen hasta el octavo día y luego entran en una fase de crecimiento cero.

Este si es un dato definitivo para afirmar la tolerancia a sequía de estas transgénicas, ya que no sólo no cesan su crecimiento en condiciones de ausencia de riego, sino que su biomasa final es sensiblemente superior a la de las líneas silvestres.

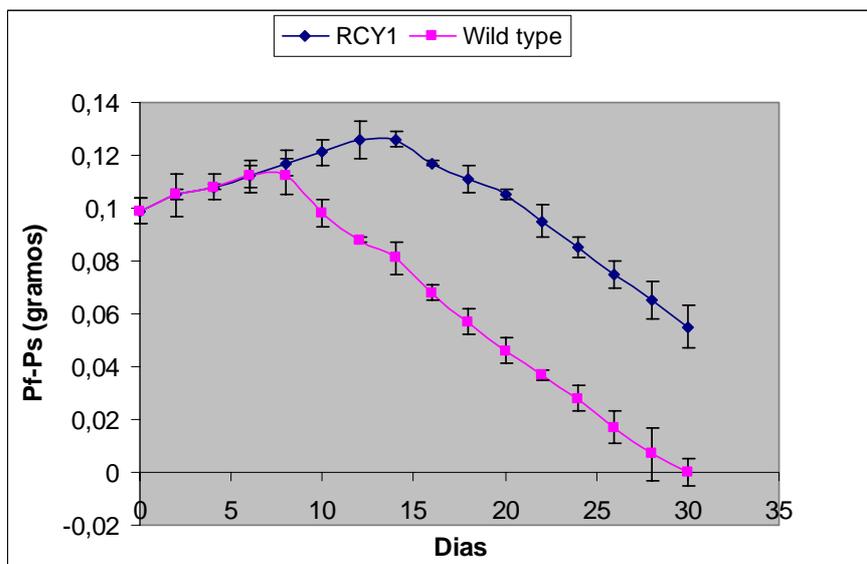


Fig. 45: Análisis funcional de RCY1 por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Representación gráfica de la diferencia entre el peso fresco y el seco (Eje Y) con respecto al día de recolección. Los tratamientos se realizaron igual a las anteriores figuras.

En esta última figura, podemos observar un media de la diferencia entre el peso fresco y seco de cada planta recogida. Así, observamos como a los 30 días después del tratamiento, las plantas silvestres quedan absolutamente secas, es decir no existe diferencia entre peso fresco y seco, mientras que todavía podemos observar hidratación en las transgénicas.

4.4.3 TOLERANCIA A LiCl

El tratamiento realizado para observar si existe tolerancia a LiCl es exactamente el mismo que en el caso del NaCl, a excepción de la concentración de sal añadida a la solución nutritiva, que en este caso fue de 100mM.

Los resultados obtenidos son similares que en el caso del experimento con cloruro de sodio.

Como se puede observar en la figura 46, las plantas sobreexpresando *RCY1* son capaces de desarrollar el tallo floral después del tratamiento con cloruro de litio, en contraste con las plantas silvestres. Concretamente el 85% de las plantas transgénicas lo desarrollan, frente a sólo un 2% de plantas silvestres.



Fig. 46: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Tratamiento con LiCl 100mM en plantas transgénicas sobreexpresando *RCY1*, comparado con líneas silvestres (control). Todas las líneas se crecieron durante 15 días, momento en el que a la solución nutritiva se le añadió 100 mM de LiCl, hasta 7 días después cuando se tomó esta foto

Los datos de peso seco y fresco son similares también al apartado 5.4.1, y en este caso se expondrán de forma numérica y no gráfica.

Así, transcurridos 12 días desde el inicio del tratamiento, obtenemos los siguientes pesos medios (obtenidos de la media realizada entre 60-80 plantas según el caso):

LiCl (mM)	Peso fresco (gramos)		Peso seco (gramos)	
	Silvestre	RCY1	Silvestre	RCY1
0	0.253 ± 0.018	0.247 ± 0.009	0.022 ± 0.002	0.022 ± 0.002
100	0.015 ± 0.002	0.16 ± 0.008	0.0165 ± 0.002	0.019 ± 0.002

Tabla 1: Análisis funcional de *RCY1* por sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* Representación del peso fresco y seco de plantas silvestres y sobreexpresando *RCY1*, después de tratamientos con LiCl.

Estos valores vienen a confirmar el hecho de que la sobreexpresión del gen de estudio otorga cierta tolerancia a sal, ya que permite un mayor crecimiento (peso seco), así como una

mayor capacidad para conservar la humedad (peso fresco), en plantas tratadas durante 12 días con 100mM de esta sal.

En resumen, hay que destacar que este gen sobreexpresado, es capaz de otorgar un grado de tolerancia a sal (NaCl y LiCl), suficiente para que la planta logre sobrevivir más tiempo, incluso llegando a reproducirse de forma normal. Pero se puede afirmar también que esta tolerancia no es exclusiva frente al componente tóxico de la sal (LiCl 100mM), sino que hay una respuesta frente al estrés osmótico provocado por la ausencia de riego.

4.4.4 TOLERANCIA A CALOR Y FRÍO

Se sometió a plantas de *Arabidopsis thaliana* sembradas en maceta, a un tratamiento de 37°C y 42°C, durante diferentes tiempos. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes y no se logró observar mayor vigor de las plantas transgénicas con respecto a las silvestres.

El mismo experimento fue llevado a cabo a 4°C, obteniéndose también un resultado inconcluyente.

Aunque hay muchos genes de respuesta general a estrés, que responden a ambas situaciones, estrés osmótico y choque térmico, en este caso parece que *RCY1* no es un gen de respuesta general a estrés, sino que parece que sólo intervenga en procesos de estrés salino e hídrico.

4.5 ANÁLISIS DE UN MUTANTE “*knock out*” DE *RCY1*

Se trata del mutante SALK_013352, cedido por el “SALK Institute”, y creado a partir de una inserción de T-DNA (Alonso et al., 2003). La inserción se localiza en el primer intrón del gen *RCY1* (Ver figura 6), y viene subrayada en color fucsia (CT).

En primer lugar se comprobó si existía expresión del gen, por lo que se realizó un análisis RT-PCR usando las parejas de cebadores RS-F1 con RS-R1, CYC-F1 con CYC-R1 y CYC-F1 con RS-R1. Con esta combinación de cebadores se cubría la expresión génica del fragmento de DNA codificante para el dominio RS, el dominio ciclina y de ambos dominios.

El resultado del análisis de la primera generación de semillas recibidas desde el “SALK Institute” (3ª generación según se observaba en las instrucciones de envío), fue

positivo para la mayoría de los casos en las tres combinaciones, por lo que las semillas recibidas fueron catalogadas como mezcla de homocigotos y heterocigotos para la expresión de *RCY1*. Este hecho también se comprobó al realizar un análisis PCR, ya que al realizar el experimento con la pareja de cebadores CYC-F1 y RS-R1, se obtuvo un total de 2 bandas de DNA en la mayoría de los casos, una menor de 1200kb que coincide con el tamaño íntegro del gen, y otra de mayor tamaño correspondiente a la suma del gen con el t-DNA insertado gracias al vector pROK (Alonso et al., 2003). En otros casos solo se obtenía la banda menor, homocigotos sin inserción, pero en otros sólo la banda mayor, homocigotos para la inserción.

La tabla que representa el porcentaje de bandas obtenidas por PCR es la siguiente:

	Porcentaje obtenido	Porcentaje esperado
1 banda menor	27%	50%
1 banda mayor	28%	17%
2 bandas	45%	33%

Tabla 2: Análisis de un mutante “knock out” de *RCY1*. Representación numérica del porcentaje de plantas con un determinado patrón de bandas, según posean t-DNA (1 banda mayor), no lo posean (1 banda menor), o sean heterocigotas para este carácter (2 bandas).

El porcentaje de 1 banda menor, corresponde a las plantas con los dos alelos silvestres (plantas RR), el de 1 banda mayor, corresponde a las plantas con dos alelos con t-DNA (plantas rr) y el de 2 bandas se corresponde con la heterocigotas (plantas Rr).

Esta segregación fenotípica 2:1:1 es la típica de plantas correspondientes a la 2ª generación, con lo que así pudimos comprobar que la segregación fenotípica era anómala, si se cumplía la premisa de que las plantas recibidas eran de la 3ª generación y no se correspondía con la segregación 3:2:1 esperada (rr:Rr:RR respectivamente).

Se prosiguió con el análisis sembrando las semillas recibidas en placas que contenían kanamicina [Marcador de selección para el t-DNA insertado (Alonso et al., 2003)], para eliminar las plantas RR que no aportarían nada al estudio.

El porcentaje de germinación fue del 75% por lo que se confirmaba la segregación 2:1:1, es decir sólo la plantas Rr y rr podían crecer en presencia de este antibiótico.

4.5.1 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES “K.O.”

Se sembraron en maceta las plantas que habían sido capaces de germinar en presencia de kanamicina, y teniendo en cuenta que dos tercios eran aún heterocigotas, se inició el análisis fenotípico, ya que aproximadamente un tercio de las plantas no era capaz de formar semillas, presentando silicuas de menor tamaño y vacías (Ver figura 47).

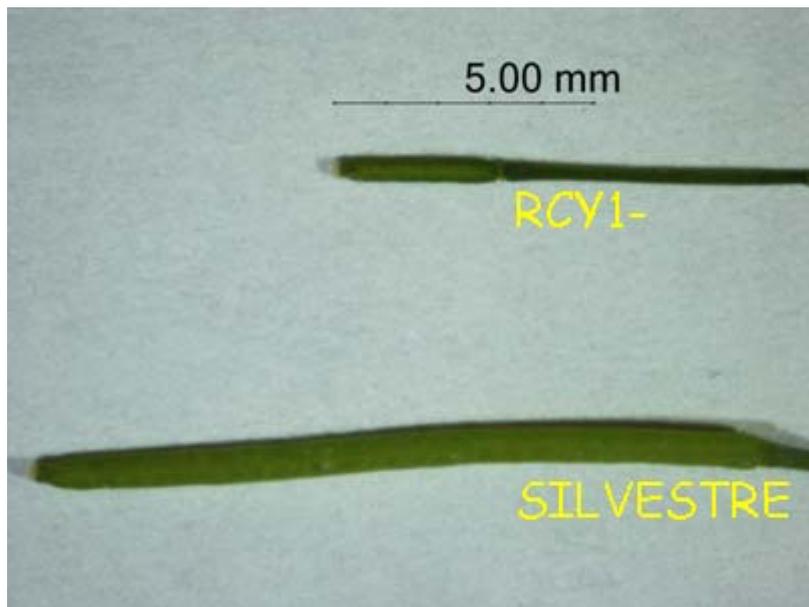


Fig. 47: Análisis de un mutante “knock out” de *RCY1*. Comparación entre las silicuas de plantas mutantes carentes del gen *RCY1* (*RCY1*-) y silvestres.

Fue en este momento cuando se encontró explicación a la segregación anómala, las plantas *rr*, y por tanto poseedoras de dos alelos con inserción de t-DNA, eran estériles.

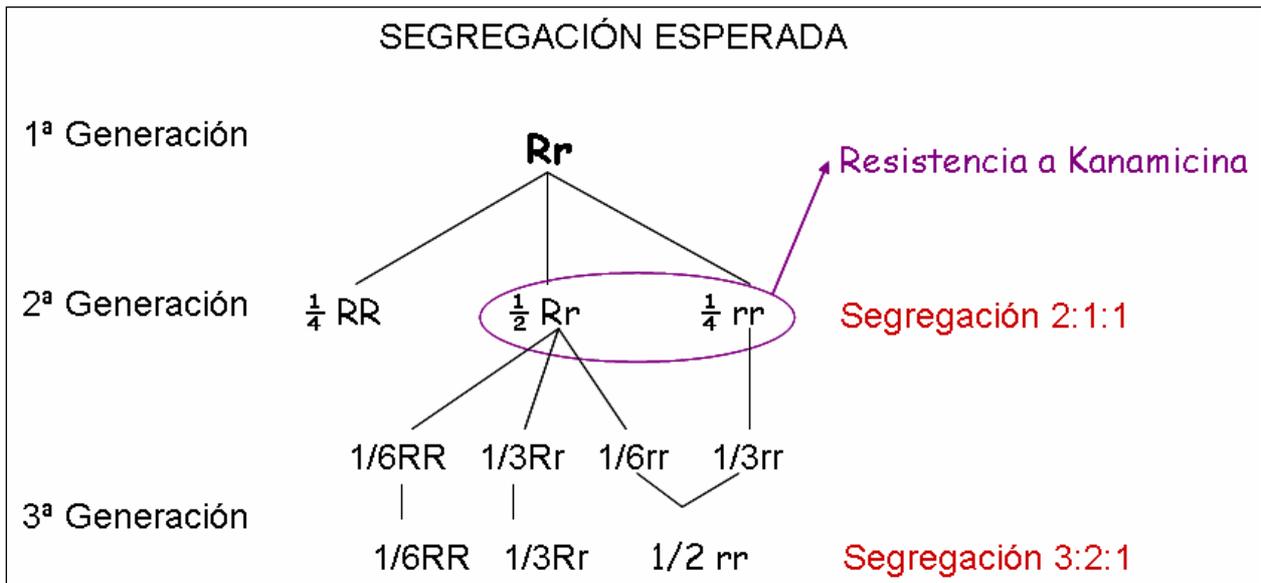


Tabla 3: Análisis de un mutante “knock out” de *RCY1*. Representación de la segregación esperada al autofecundar una planta heterocigota, para un gen dialélico.

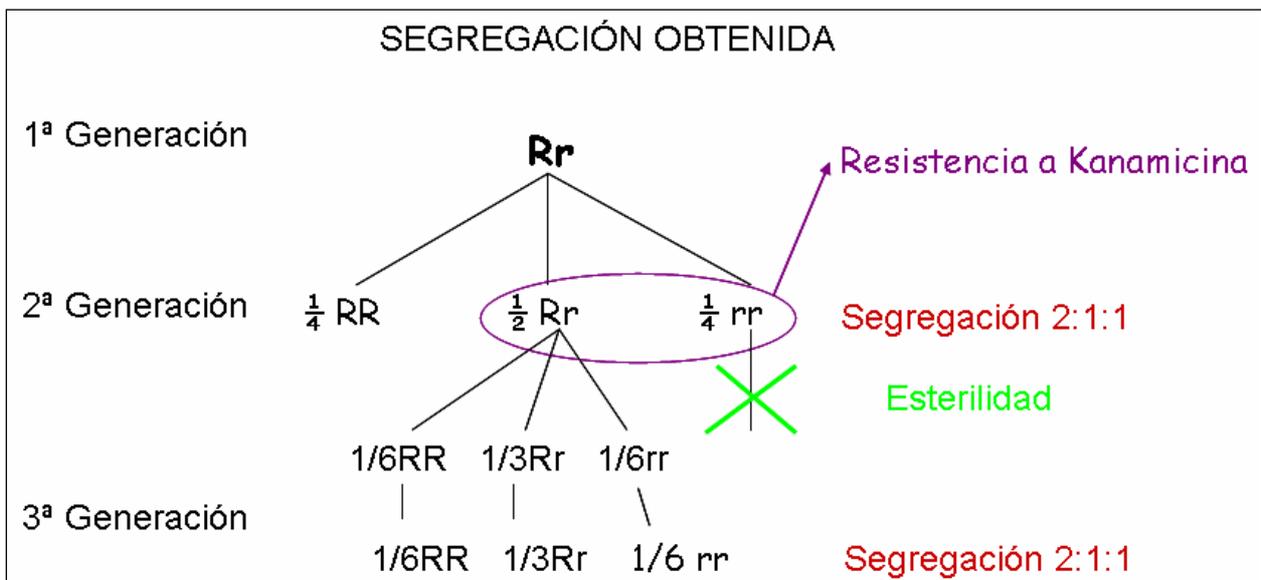


Tabla 4: Análisis de un mutante “knock out” de *RCY1*. Representación de la segregación obtenida al autofecundar una planta heterocigota, para un gen dialélico, en caso de que uno de los alelos en homocigosis, provoque esterilidad.

Para comprobar esta hipótesis se realizó el análisis PCR de las plantas sin semillas, obteniéndose que efectivamente, éstas poseían exclusivamente la banda mayor con el t-DNA insertado.

La explicación de este fenómeno es clara, las plantas homocigotas, y por tanto estériles, no poseían polen maduro (Ver figura 48).



Fig. 48: Análisis de un mutante “knock out” de *RCY1*. Observación en fresco de los estambres de plantas silvestres y carentes de *RCY1* (*RCY1-*).

Con respecto al resto de caracteres de la planta, todos los tejidos parecían ser exactamente iguales a los de las plantas silvestres. Por tanto, fenotípicamente hablando, el único rasgo diferencial de los mutantes, es la ausencia de polen y por consiguiente de reproducción.

Incluso, se realizaron emasculaciones de las anteras de estas plantas mutantes, y se fecundó el estigma con polen de plantas silvestres, obteniéndose silicuas con semillas. Las plantas conseguidas a partir de estas semillas eran fenotípicamente normales.

Este fenómeno viene a confirmar la expresión topográfica de *RCY1*, es decir, este gen se expresa principalmente en anteras (Ver apartados 5.2.4 y 5.3) y además, su mutante “K.O.” provoca la ausencia de polen, por lo que la principal función de este gen podría estar situada en algunas células del estambre encargadas de formar el polen.

4.5.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MUTANTES “K.O.”

Este análisis consistió en someter a las plantas mutantes, a tratamientos estresantes, para observar si comparadas con el fenotipo silvestre, existían variaciones en el comportamiento. Existía el problema de la esterilidad del homocigoto, así que se decidió sembrar la mezcla de plantas en homo y heterocigosis, realizar los ensayos de tolerancia a estrés, y a posteriori comprobar por medio de RT-PCR si eran o no homocigotos.

Antes de conocer estos tratamientos, hay que indicar que el crecimiento sin estrés de las plantas silvestres y mutantes “knock out” para *RCY1* es muy similar (Ver Tabla 5), por lo que se descarta una menor tasa de crecimiento inicial de cualquiera de los dos tipos.

	Peso fresco 20 días (gramos)	Peso fresco 30 Días (gramos)	% de tallos florales totales
Silvestre	0.19 ± 0.012	0.24 ± 0.01	100%
Rr	0.195 ± 0.009	0.25 ± 0.011	100%
rr	0.19 ± 0.015	0.235 ± 0.009	100%

Tabla 5: Análisis de un mutante “knock out” de *RCY1*. Representación del peso fresco y porcentaje de tallos florales de plantas silvestres, heterocigotas para el T-DNA insertado en el gen *RCY1* (Rr), y homocigotas sin expresión de *RCY1* (rr). No se realizó ningún tratamiento estresante.

Así pues, se sembraron las semillas mutantes y silvestres en maceta, y transcurridos 15 días se inició el tratamiento con 50mM de NaCl y 20mM de LiCl. Paralelamente se sembraron más semillas y transcurridos 7 días se cesó el riego, para así poder comprobar la respuesta a estrés hídrico.

7 días después del inicio del tratamiento, en el caso de las sales, y 20 días después de la ausencia de riego, se recogieron plantas que se pesaban en fresco y se identificaban para su posterior análisis por RT-PCR.

Se escogieron condiciones de tratamiento salino más suaves, y menos tiempo de sequía porque así se pueden observar diferencias más sutiles en el crecimiento.

Una vez obtenido el resultado del análisis de expresión, se agruparon los pesos frescos en tres categorías:

	NaCl	NaCl	LiCl	LiCl	Sequía	Sequía
	Pf	%	Pf	%	Pf	%
Silvestre	0.17 ± 0.009	90%	0.15 ± 0.01	65%	0.058 ± 0.003	10%
Rr	0.165 ± 0.009	85%	0.155 ± 0.011	62%	0.056 ± 0.004	7%
rr	0.16 ± 0.01	84%	0.155 ± 0.09	70%	0.056 ± 0.008	7%

Tabla 6: Análisis de un mutante “knock out” de *RCY1*. Representación de los valores de peso fresco (Pf) y porcentaje de desarrollo del tallo floral (%) de plantas silvestres, heterocigotas para la inserción de t-DNA en el locus *RCY1* (Rr) y sin expresión de *RCY1* (rr), para plantas tratadas con 250mM de NaCl durante 7 días, 100mM de Lic. Durante 7 días y ausencia de riego (Sequía) durante 20 días.

Ninguno de los tratamientos estresantes realizados (Ver Tabla 6) logró modificar el patrón de crecimiento de las plantas mutantes con respecto a las silvestres. Es decir, los pesos y porcentajes de floración son prácticamente idénticos por lo que se deduce que la pérdida de expresión del gen de estudio no afecta en nada a la reacción de la planta frente a un estrés salino u osmótico.

En principio cabía esperar que las plantas mutantes fueran más sensibles, ya que parece que RCY1 es un elemento importante en la tolerancia a estrés, pero esto no sucede, pudiendo deberse a la redundancia génica, es decir, que otro gen similar ocupe su función en cuanto a tolerancia (no frente a formación del polen). También podría ocurrir que este gen no sea en absoluto importante para la tolerancia general de la planta, y que si lo sea para la tolerancia en el polen, que es donde se expresa, pudiendo actuar también a nivel general si hay sobreexpresión artificial.

En resumen, a nivel silvestre, RCY1 juega un papel determinante en algún momento de la formación del polen maduro, pero no es importante para la tolerancia a estrés osmótico y salino.

4.6 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE RCY1

Uno de los datos que más luz puede aportar sobre el modo de acción este gen en la tolerancia a estrés salino e hídrico, es el de la localización de la proteína RCY1 dentro de la célula. Así se podrá intuir en que procesos celulares destaca por su presencia.

Para realizar este abordaje se decidió contactar con el laboratorio de Peter Shaw, en el John Innes Institute (Norwich, Reino Unido), ya que es uno de los laboratorios con más experiencia en localización subnuclear de proteínas, y recordemos que en humanos, la homóloga de RCY1 es una proteína nuclear. Así pues, después de haber barajado todas las posibilidades, y teniendo en cuenta la dificultad que existe en hacer anticuerpos concretos de las proteínas SR, por las reacciones cruzadas que se producen (Blencowe et al., 1994; 1995), se decidió usar la técnica de la fusión génica entre el gen de estudio y la proteína GFP), para su posterior observación “in vivo”.

Esta técnica consiste en clonar en un vector de expresión de *Arabidopsis thaliana*, la secuencia codificante del gen a localizar, en este caso RCY1. En el vector se encontrará la secuencia codificante de la GFP, pudiendo estar tanto en el extremo 3' como en el 5', y todo ello flanqueado por la secuencia del promotor 35S y un terminador de la transcripción. Con

esto se consigue que la proteína que se traduzca finalmente, posea en uno de sus extremos la GFP, y en el otro la proteína a localizar.

Concretamente en este caso se utilizó el método de clonación “GATEWAY” para realizar este proceso. En primer lugar se amplificó por PCR un fragmento de DNA que contenía el gen de estudio, gracias a los cebadores GATRCY-F1 y GATRCY-R1. Posteriormente se realizó la recombinación homóloga con el vector madre pDONR, a la que siguió otra recombinación con el vector pGFP.

Una vez conseguido purificar el vector completo, se comprobó por PCR el tamaño del inserto, y se prosiguió con la transformación de *Agrobacterium tumefaciens*. Directamente, se transformaron células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* y se observó una alícuota de células transcurridos 3 días.

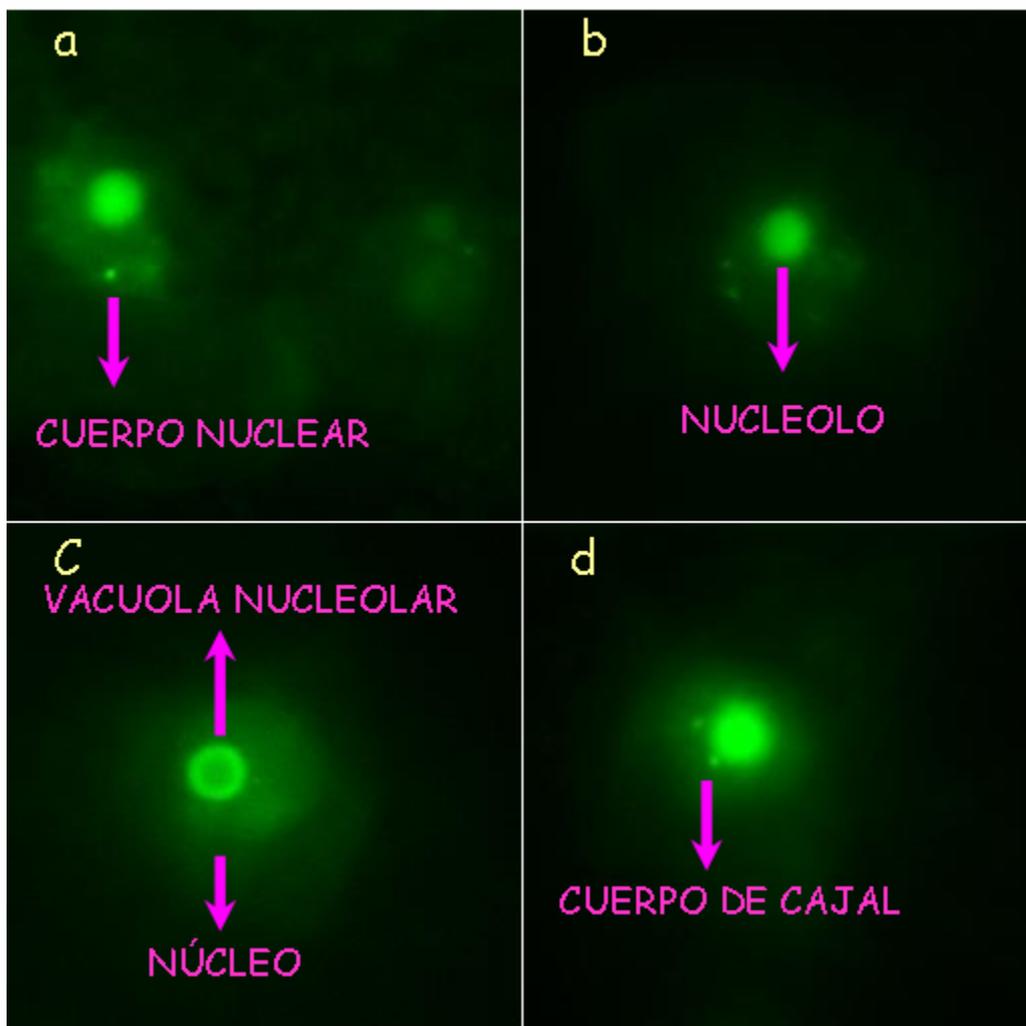


Fig. 49: Localización subcelular de RCY1. Observación “in vivo” al microscopio óptico de la fusión entre GFP y RCY1. Todas las fotos pertenecen a la fluorescencia de la fusión entre GFP y RCY1, pero nos muestran los distintos orgánulos en los que se localiza. En (a) vemos la fusión en el nucleolo, cuerpo nuclear y vagamente en el nucleoplasma. En (b), se observa en el nucleolo y algunos cuerpos nucleares. En (c) podemos observar a la fusión en el nucleolo y vagamente en el nucleoplasma, pero no en la vacuola nucleolar. Por último en (d) observamos el nucleolo, nucleoplasma, algunos cuerpos nucleares, y probablemente en un cuerpo de Cajal.

El resultado del experimento fue bastante claro (Ver figura 49). RCY1 se localizaba claramente en el núcleo, pero concentrándose principalmente en el nucleolo, cuerpos nucleares y posiblemente en los cuerpos de Cajal. Destaca también por su ausencia en la vacuola nucleolar (Ver figura 49c) (Jordan, 1984; Johnson 1969). No se detectó la presencia de esta proteína en el citoplasma.

En primer lugar, el nucleolo es una de las primeras estructuras celulares que se describió (Wagner, 1835; Valentin 1836) ya que posee la mayor concentración de masa de la célula (Vincent, 1955). Su principal función es la de ser el soporte para la síntesis del RNA ribosómico (Perry, 1960; Edström, 1962), localizándose en el la RNA polimerasa I, aunque también tiene importantes funciones en el transporte de mRNA (Sidebottom and Harris, 1969) y la síntesis de este, (Oakes et al., 1993) ya que en el se localiza parte de la RNA polimerasa II. Otra función conocida es la de contener a ciertas telomerasas (Etheridge et al., 2002).

En segundo lugar, los cuerpos de Cajal deben su nombre a su descubridor (Cajal, 1903) y son unas pequeñas acumulaciones de proteínas y ácidos nucleicos, cercanas al nucleolo (Boudonock et al., 1999), pero que siguen siendo aún estructuras de muy difícil identificación (Gall, 2000), existiendo marcadores presenciales como la coilina (Raška et al., 1991) o el factor U2B (Beven et al., 1995; Boudonock et al., 1998). En el se localizan numerosas proteínas de procesamiento de pre-RNA (Carmo-Fonseca et al., 1991; 1992; Matera and Ward, 1993), pero se cree que este proceso no se produce en ellos debido a la ausencia de otros factores importantes como SC35 o U2AF (Gama-Carvalho et al., 1997). Aunque pueda ser considerado un reservorio de estos factores de splicing (Charroux et al., 1999) es sin duda también un componente activo del procesamiento, pero en el caso de los snRNAs (Frey and Matera, 1995; Schul et al., 1998) y del pre-RNA de histonas (Abbot et al., 1999). También se le atribuyen funciones como el transporte y/o modificación de los factores de splicing (Lammond and Earnshaw, 1998; Sleeman and Lammond 1999).

En tercer lugar, los cuerpos nucleares son cúmulos de proteínas nucleares que ocupan el espacio intercromatínico y que aparecen en número superior a 25 e inferior a 50 dentro del nucleoplasma (Spector, 1993). Están compuestos principalmente de proteínas relacionadas con el pre-mRNA splicing, aunque en ellos se puede localizar elementos relacionados con la transcripción, como la RNA polimerasa II (LaMorte et al., 1998). Debido a su gran movilidad, se localizan también en el espacio pericromatínico (Spector 1999), factor que unido a la presencia de la RNA polimerasa II y a los factores de splicing, otorga a estos cuerpos la función de transcribir y procesar el RNA (Bentley 1999).

Por tanto, gracias a este experimento hemos podido acotar un poco más la función de RCY1 y su posible acción en la tolerancia a sal. Por su localización es probable que actúe en los procesos relacionados con el procesamiento de RNA, ya sea su transcripción, splicing, o transporte.

4.6.1 COLOCALIZACIÓN DE RCY1

Con el fin de confirmar que RCY1 se localiza en los lugares anteriormente citados, se procedió a coexpresar la proteína RCY1 fusionada con la GFP, con otras proteínas de localización comprobada, fusionadas a la RFP (Proteína con autofluorescencia roja).

Los vectores de expresión conteniendo la fusión entre ciertas proteínas, marcadoras de localización subnuclear, y la RFP, fueron cedidos por el Dr. Peter Shaw.

El primer paso consistió en transformar *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores escogidos, pero por separado. Después se procedió a la coinfección de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, conteniendo RCY1-GFP y otra conteniendo proteína nuclear-RFP.

Como proteínas marcadoras se utilizaron U2B (cuerpos de Cajal), FI61 (Nucleolo) y EIF4 (cuerpos nucleares) (como fuente se utilizaron los datos propios obtenidos en el laboratorio del Dr. Shaw). Teniendo en cuenta que la probabilidad de que se exprese la GFP fusionada es menor al 1%, y de que lo haga la RFP es menor al 0.05%, solo se consiguió que se coexpresaran la RCY1 con FI61 (Ver Figura 50).

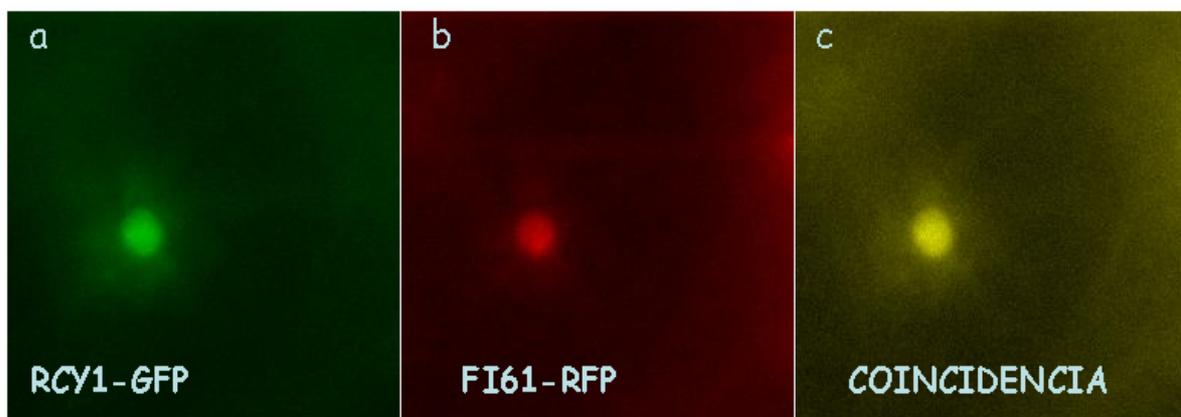


Fig. 50: Localización subcelular de RCY1. Autofluorescencia de las proteínas RCY1 y FI61 fusionadas respectivamente con GFP y RFP (50a y 50b respectivamente). En 50c se representa una imagen que sólo muestra la zona de coincidencia entre ambas.

Por tanto, está comprobado que uno de los lugares en donde se expresa RCY1 es el nucleolo, ya que la coincidencia es exacta. Hay que destacar que RCY1 además posee fluorescencia en otros cuerpos nucleares (Ver figuras 49 y 50a) que no aparecen en FI61 (Ver figura 50b), al igual que RCY1 no posee una zona de mayor fluorescencia subnucleolar, característica de FI61.

Debido a que los cuerpos nucleares son muy diversos, y su propia definición dice son cúmulos proteicos en general, es innecesario diseñar otro tipo de experiencias para colocalizarlos y confirmar que la proteína de estudio se localiza en ellos. Es decir, sólo con la presencia de cúmulos en el nucleoplasma (Ver figura 49) se puede afirmar con rotundidad que pertenecen al grupo de los cuerpos nucleares, pero sin poder precisar de que tipo, siendo incluso la existencia de cuerpos de Cajal, una hipótesis probable.

4.6.2 DINÁMICA DE RCY1 EN RESPUESTA A SAL.

Confirmada en apartados anteriores la relación existente entre el gen de estudio y la sal (NaCl), se pretende comprobar si este tipo de estrés provoca alteraciones en el patrón observado para la localización de RCY1.

Con esta finalidad se diseñó un ensayo en el que se sometería a las células en suspensión, ya transformadas con la fusión RCY1-GFP, a cambios en la concentración de NaCl en el medio, observándose posteriormente la reacción de dicha fusión.

En primer lugar se escogió un tiempo fijo de exposición a la sal, 20 minutos, y se fue variando la concentración de NaCl.

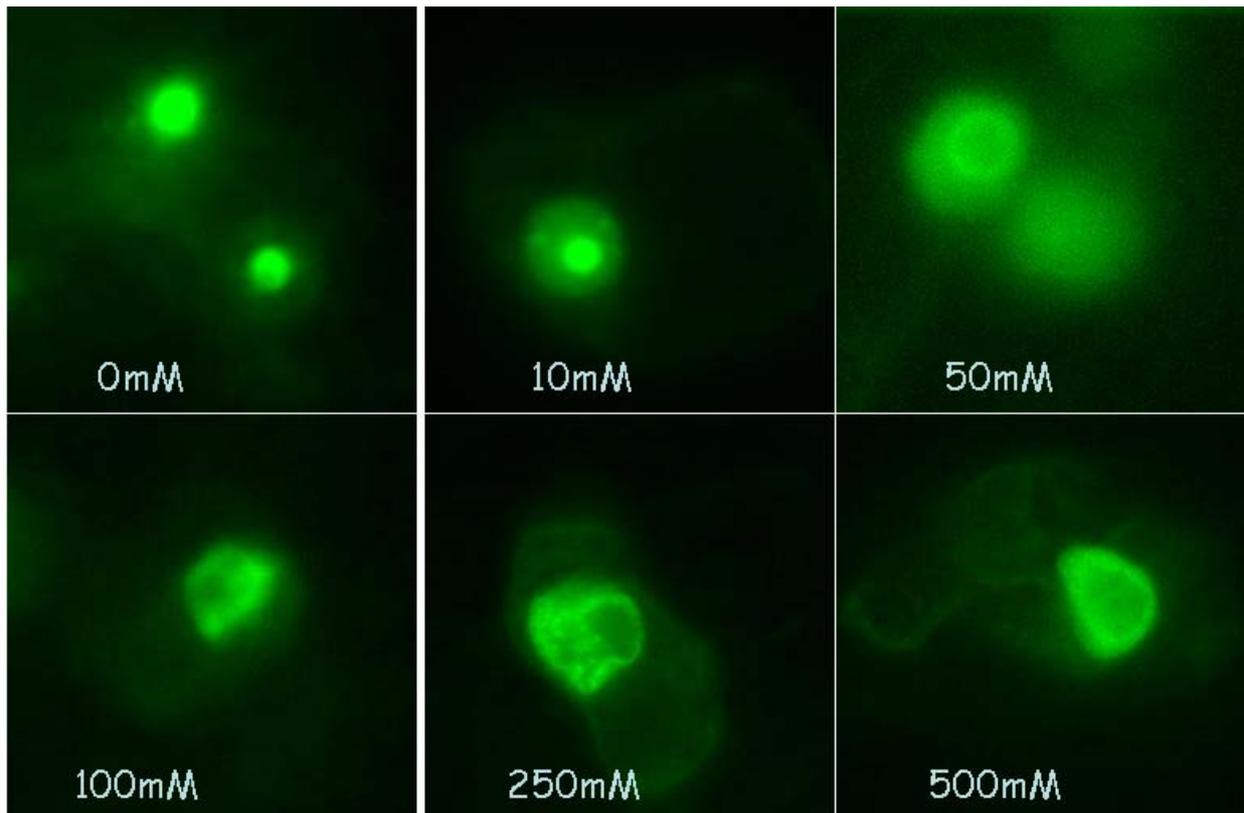


Fig. 51: Localización subcelular de RCY1 en respuesta a estrés salino. Observación “in vivo” de la dinámica de la fusión RCY1::GFP, al añadir distintas concentraciones de NaCl durante 20 minutos.

Esta reacción fue inesperada (Ver figura 51). RCY1 es una proteína muy dinámica que reacciona a sal. Así, con 10mM de NaCl, ya se puede observar un principio de deslocalización de parte de la proteína, del nucleolo, al nucleoplasma, siendo esta deslocalización aún mayor con 50mM. Con esta misma concentración, también podemos observar un aumento de la vacuola nucleolar, o un movimiento de la proteína hacia la envoltura nuclear. Este fenómeno se agudiza aún más con la siguiente concentración testada, 100mM, aumentando la vacuola nuclear, o posicionándose la mayor parte de la proteína en la envuelta nuclear. Este proceso es más claro a 250mM, concentración a la cual, la proteína incluso llega a salir al citoplasma. Finalmente, a 0.5M, el fenómeno se completa al colocarse la totalidad de la proteína en la envuelta.

Hay que indicar, que en este proceso podría influir la pérdida de turgencia por parte de la célula, al añadir estas concentraciones salinas. No existe ninguna referencia acerca de este tipo de ensayos en la bibliografía, pero teniendo en cuenta que las células en suspensión poseen pared celular y no son protoplastos, se considera que una concentración de NaCl de hasta 100mM, podría ser tolerada por la célula sin mayor problema. Este hecho se corrobora al observar que en la figura 29, es a esta concentración de 100mM, cuando el núcleo, empieza a perder su figura esférica.

En segundo lugar, se diseñó otro experimento, a concentración salina fija, 100mM (NaCl), y usando el tiempo como diferencial.

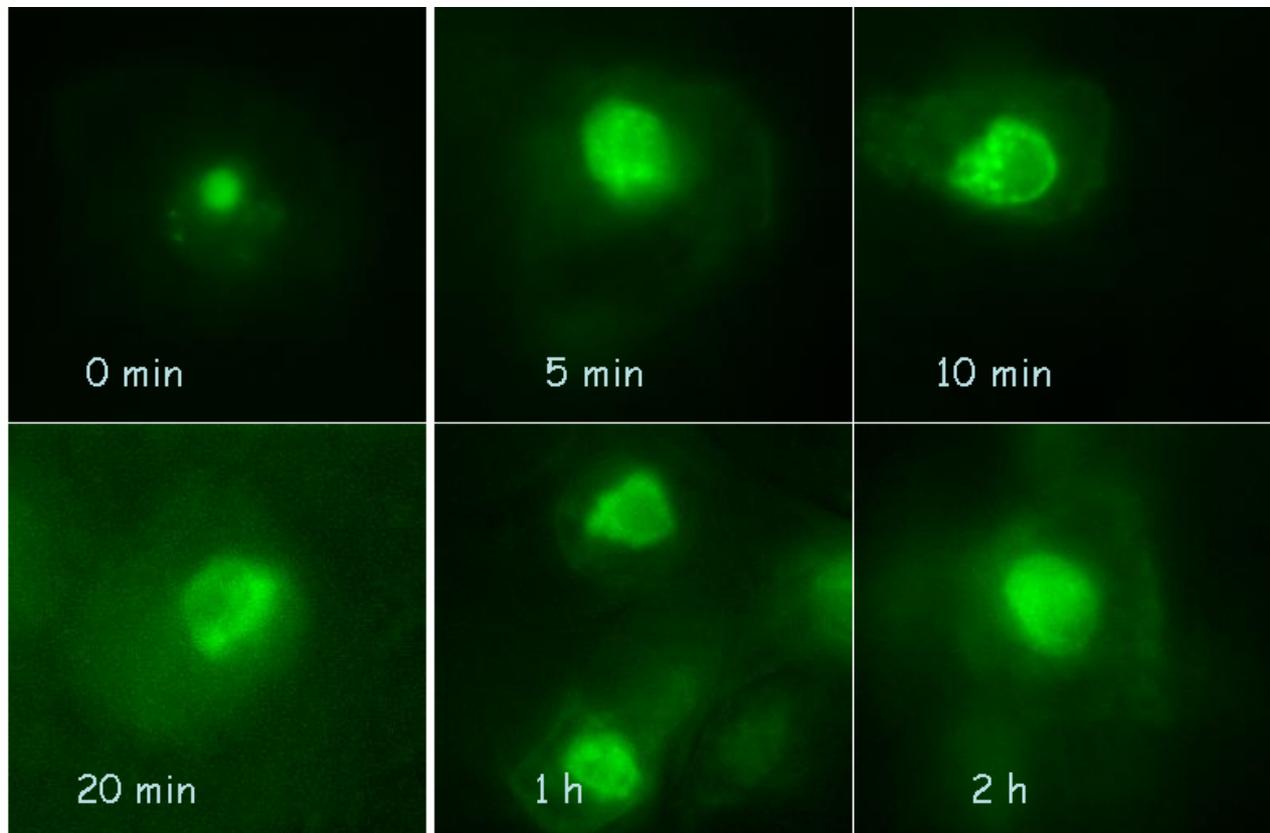


Fig. 52: Localización subcelular de RCY1 en respuesta a estrés salino. Observación “in vivo” de la dinámica de la fusión RCY1::GFP, al añadir distintas una concentración fija de NaCl, 100mM, e incubar a distintos periodos temporales, indicados bajo cada foto.

No observamos ninguna evolución aparente de la dinámica al variar el tiempo, es decir la deslocalización de RCY1 no se debe a una variación acumulativa temporal, sino que, según observamos (Ver figura 52), el movimiento de esta proteína es dependiente de la concentración.

Se comprobó gracias a una cámara de perfusión que el cambio era momentáneo. Está cámara perfundía solución de cultivo de las células en suspensión con NaCl, sobre una preparación de células, ancladas a un portaobjetos pero vivas, que en todo momento estaba siendo grabada por una cámara fija adjunta al microscopio. El lapso temporal de esta cámara era de 2 segundos, y aún siendo este periodo tan corto, en un solo cambio de fotograma la disposición temporal de RCY1::GFP ya era definitiva. Es decir, el cambio de posición era incluso inferior a estos 2 segundos.

Por último, se comprobó si el cambio de posición era reversible. Para esto se diseñó una prueba en la que se añadía a las células en suspensión una solución de NaCl hasta una concentración final de 0.5M. Transcurrida 1 una hora, se centrifugaba todo a bajas revoluciones y se extraía la mayoría de líquido, quedando sólo células. Inmediatamente se añadía la misma solución de crecimiento, pero sin NaCl y se incubaba otra hora.

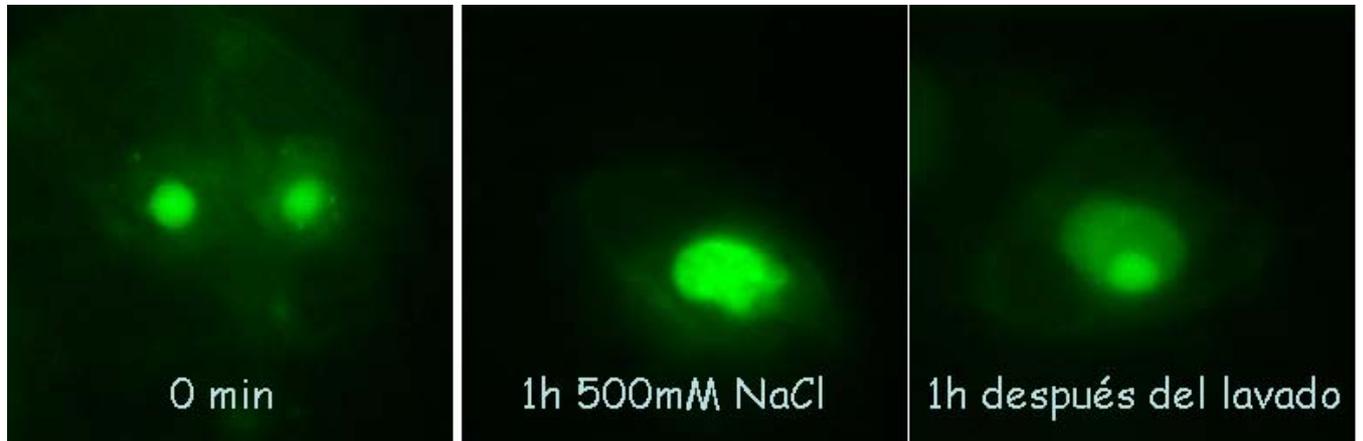


Fig. 53: Localización subcelular de RCY1 en respuesta a estrés salino. Observación “in vivo” de la dinámica de la fusión RCY1::GFP al tratar 1 hora con 500mM de NaCl, y otra hora de recuperación.

Por tanto, el cambio en la posición de RCY1 es reversible (Ver figura 53). Sólo podría hablarse de la existencia de cierta difuminación en el nucleoplasma por parte de RCY1, después del lavado. Esto podría estar causado por la alteración en la dinámica después de un fuerte choque salino, o por la presencia de NaCl que no ha podido ser eliminada en el lavado.

Para comprobar si esta reversibilidad dependía del tiempo, se ensayó el mismo experimento, pero eliminando los tiempos de una hora de incubación, es decir se añadió la sal (0.5M), rápidamente se centrifugó y para finalizar se le añadió la solución fresca sin la sal.

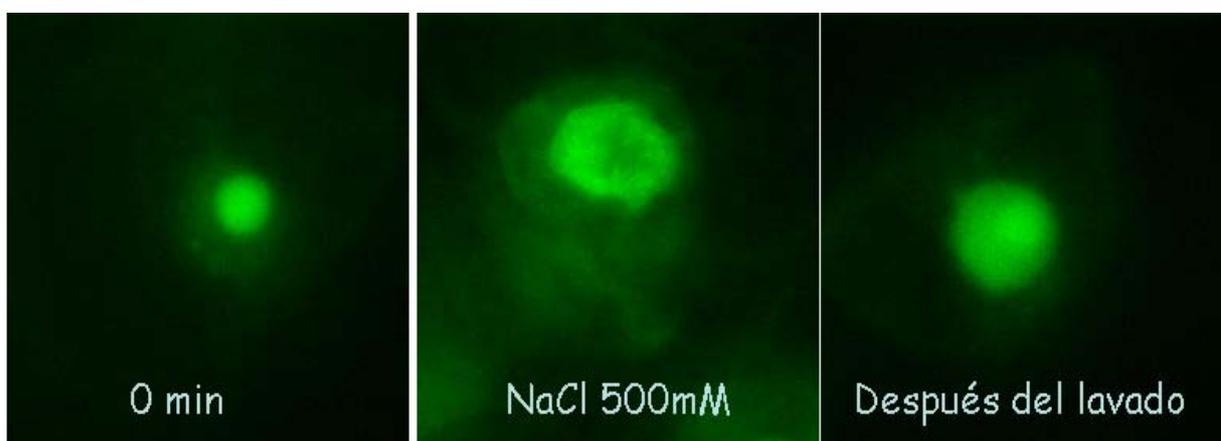


Fig. 54: Localización subcelular de RCY1 en respuesta a estrés salino. Observación “in vivo” de la dinámica de la fusión RCY1::GFP al tratar con 500mM de NaCl y lavar posteriormente.

El resultado fue el mismo (Ver figura 54), de lo que se deduce que la reversibilidad también es instantánea, y no es necesario cierto reposo celular, es decir, parece que RCY1 es capaz de reaccionar a cambios de concentración de forma inmediata.

4.6.3 LOCALIZACIÓN DE LOS DOMINIOS DE RCY1 POR SEPARADO

Con el fin de comprobar cual es el dominio responsable de la localización subcelular de esta proteína, se diseñó el mismo experimento que con la proteína completa, pero habiendo introducido los dominios RS y ciclina (Cyc) por separado junto a la GFP.

Se usaron los cebadores GATRS-F1 y GATRS-R1, para amplificar e introducir el dominio RS en el pDONR, y GATCYC-F1 junto con GATCYC-R1 para hacer lo propio con el dominio ciclina.

Mientras que en ningún momento se pudo concretar la localización del dominio ciclina, ya que se disponía en toda la célula por igual, la localización del dominio RS era clara, además de ser idéntica a la de la proteína íntegra.

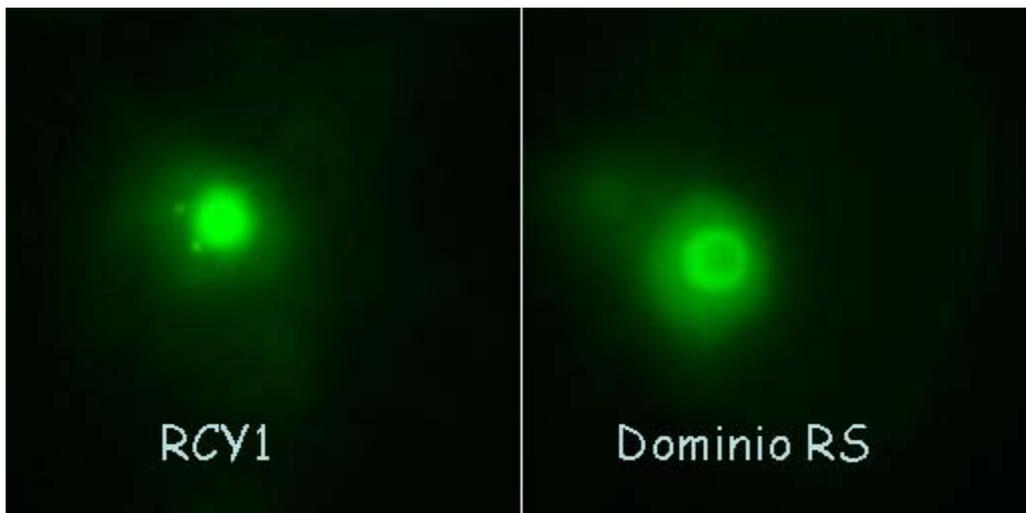


Fig. 55: Localización subcelular de RCY1 en respuesta a estrés salino. Observación “in vivo” de RCY1::GFP y RS::GFP, siendo RS el dominio N-terminal de RCY1.

Por tanto, es el dominio RS el encargado de localizar subcelularmente a la proteína entera, siendo también el que confiere la tolerancia a estrés salino (Forment et al., 2000). Estos dos datos relacionados nos indican que localización subcelular y tolerancia pueden estar relacionados.

4.7 LOCALIZACIÓN Y DINÁMICA DE OTRAS PROTEÍNAS NUCLEARES

Debido a las escasas referencias existentes acerca de la dinámica de proteínas nucleares, durante tratamientos con estrés salinos, se decidió realizar una aproximación a este problema. Se procedió localizando primero y tratando con NaCl después, una serie de plantas transformadas con una fusión entre la GFP y proteínas nucleares que se presentan en los orgánulos subcelulares en los que aparece RCY1.

El primer paso de introducir las secuencias génicas, que se traducirán en una de estas proteínas, en el vector GATEWAY, había sido ya realizado por los miembros del laboratorio del Dr. Shaw. Gracias a esta cesión se comenzó directamente por transformar *Agrobacterium tumefaciens* con cada fusión por separado, para después realizar lo propio con *Arabidopsis thaliana*.

4.7.1 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Transcurridos 3 días desde la infección, se comenzó por observar cada transformante por separado. Hay que indicar que el ensayo se realizó con múltiples proteínas, pero sólo se han seleccionado las más representativas de cada orgánulo. También hay que destacar que estas proteínas seleccionadas no intervienen, supuestamente, en la tolerancia a sal mediada por RCY1, sólo sirven de referencia para la dinámica intranuclear en tratamientos salinos.

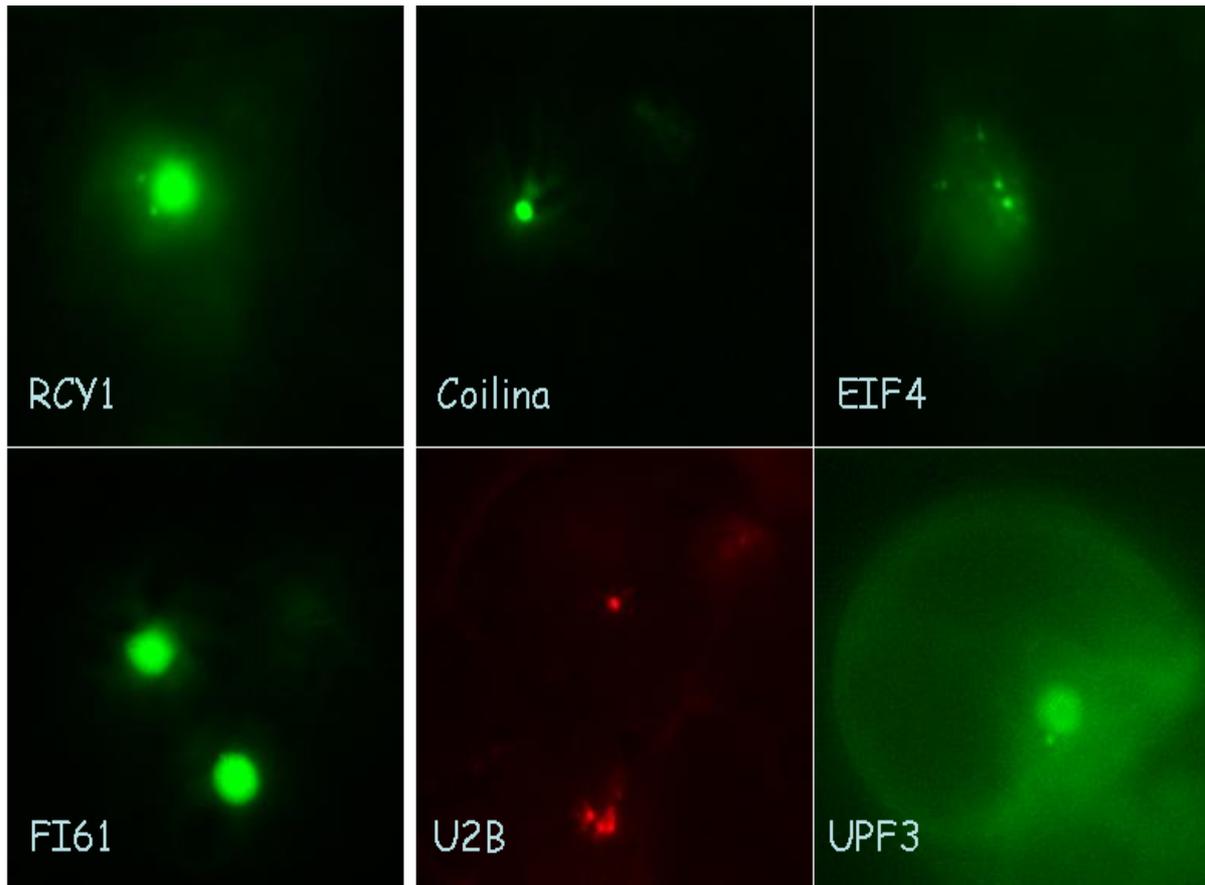


Fig. 56: Localización de proteínas nucleares. Observación “in vivo” de las fusiones entre GFP y las proteínas indicadas al pie de cada foto.

Como ya se ha indicado (Ver apartado 5.6), RCY1 se localiza en nucleolo y cuerpos nucleares principalmente. Como podemos observar en la figura 56 la coilina y U2B se localizan en los cuerpos de Cajal, de hecho su presencia es definitiva para estos cuerpos. En la misma figura vemos como EIF4 se localiza principalmente en los cuerpos nucleares, FI61 es una proteína nucleolar y UPF3 tiene una disposición similar a RCY1, nucleolar con presencia en cuerpos nucleares, diferenciándose en que UPF3 tiene una leve presencia citoplasmática.

Con estos datos previos ya podemos iniciar el estudio dinámico, que nos permitirá discernir si el caso de RCY1 como proteína móvil frente a sal es único.

4.7.2 DINÁMICA SUBCELULAR

Se realizaron los tratamientos salinos igual que en el apartado 5.6.2, durante 1 hora, y probando con 100mM y una concentración superior de NaCl según la reacción de la proteína

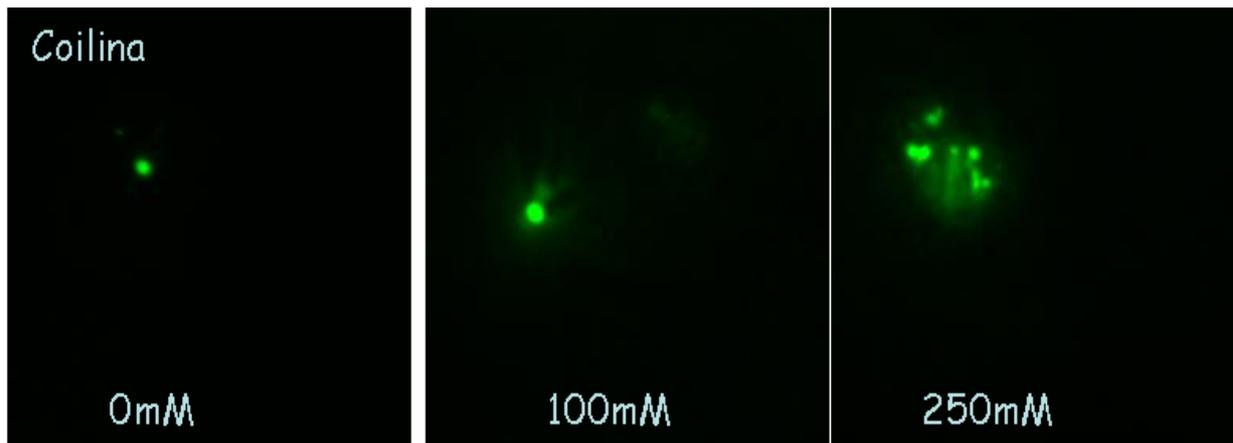


Fig. 57: Dinámica de la Coilina en presencia de NaCl. Observación “in vivo” de la fusión entre GFP y Coilina con diferentes concentraciones de NaCl.

Observamos (Ver figura 57) como la Coilina no sufre modificaciones en su patrón espacial con 100mM de sal, pero si hay un gran cambio detectado por primera vez a 250mM. Este cambio consiste en la multiplicación de cuerpos nucleares en los que se encuentra dicha proteína, o en la dispersión del cuerpo de Cajal. Por tanto la sal afecta a la disposición espacial de la Coilina, pero a mayor concentración que en el caso de RCY1 (Ver apartado 5.6.2).

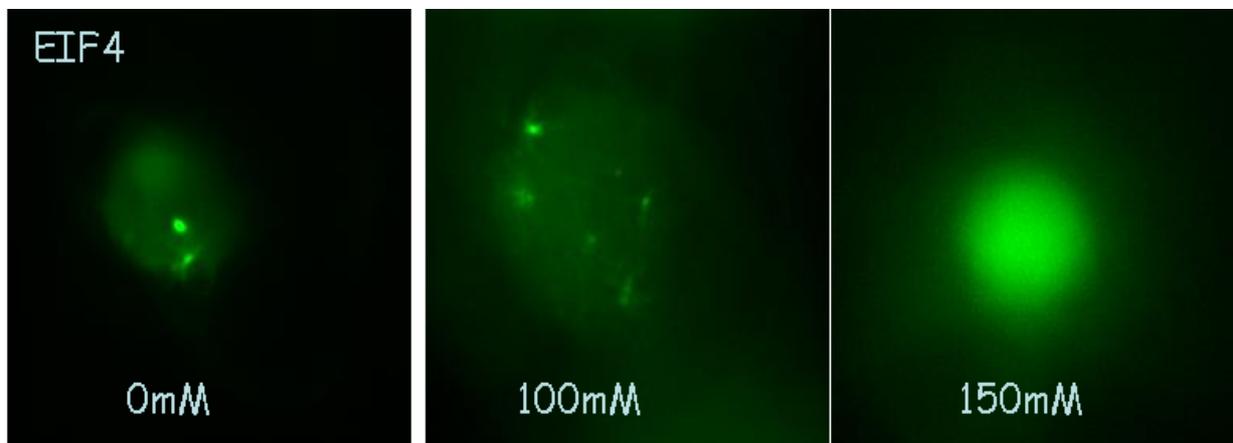


Fig. 58: Dinámica de la proteína EIF4 en presencia de NaCl Observación “in vivo” de la fusión entre GFP y EIF4 con diferentes concentraciones de NaCl.

En el caso de EIF4, también se observa un cambio, con 150mM de NaCl el patrón de disposición espacial granular, se difumina por completo, pasando la proteína a ocupar la totalidad del nucleoplasma. Este cambio se produce a una concentración intermedia entre RCY1 y la Coilina.

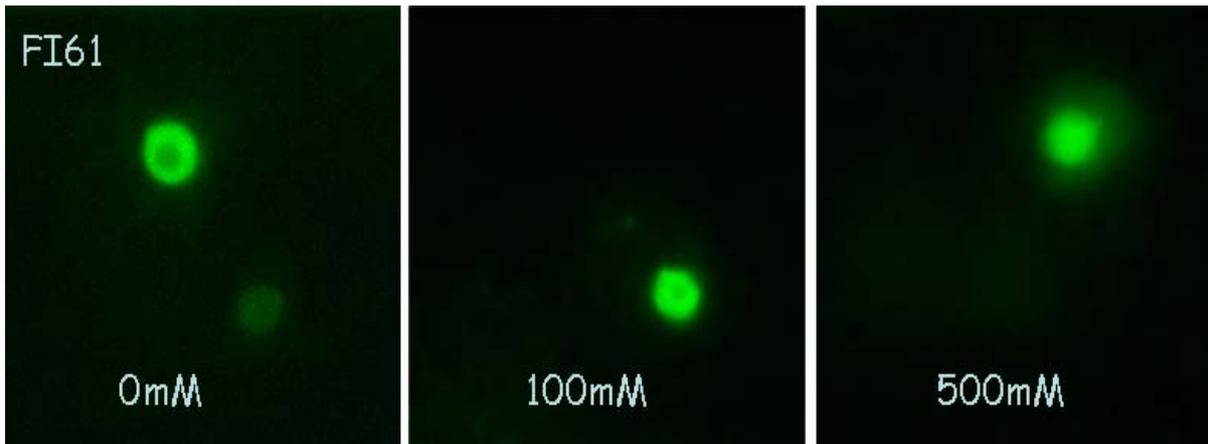


Fig. 59: Dinámica de la proteína FI61 en presencia de NaCl. Observación “in vivo” de la fusión entre GFP y FI61 con diferentes concentraciones de NaCl.

Al observar la disposición de FI61 (Ver figura 59) vemos un primer caso en el que no existe variación entre la posición con y sin sal. Hay que indicar que no se han realizado pruebas con salinidad superior a 0.5M, ya que se considera que la célula estaría demasiado plasmolítica, anulando cualquier resultado posible. Este resultado corrobora que no hay un movimiento generalizado de orgánulos en respuesta a estrés osmótico, lo que corrobora aún más el hecho de que la dinámica de RCY1 sea especial.

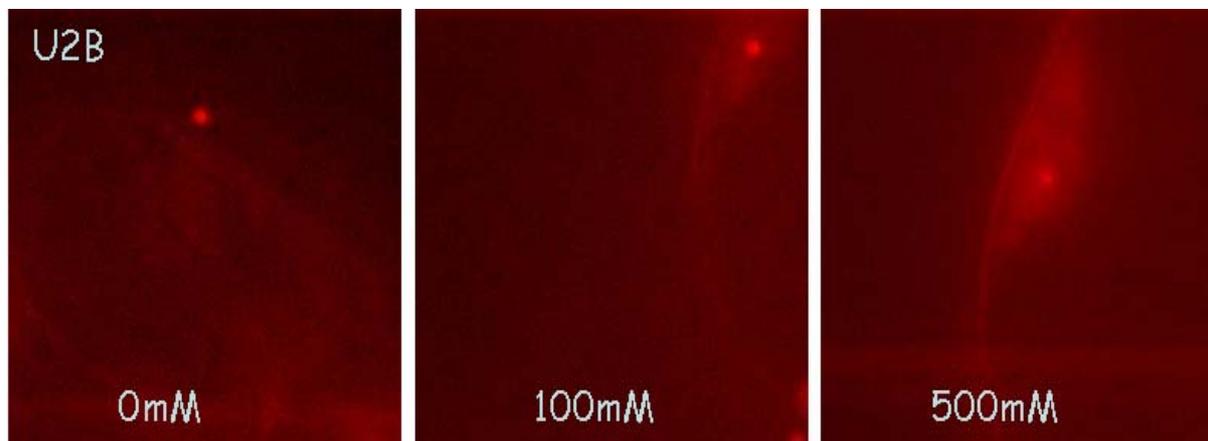


Fig. 60: Dinámica de la proteína U2B en presencia de NaCl. Observación “in vivo” de la fusión entre RFP y U2B con diferentes concentraciones de NaCl.

Este último factor también es corroborado por la ausencia de movilidad al tratamiento con NaCl de las proteínas U2B (Ver figura 60) y UPF3 (Ver figura 61).

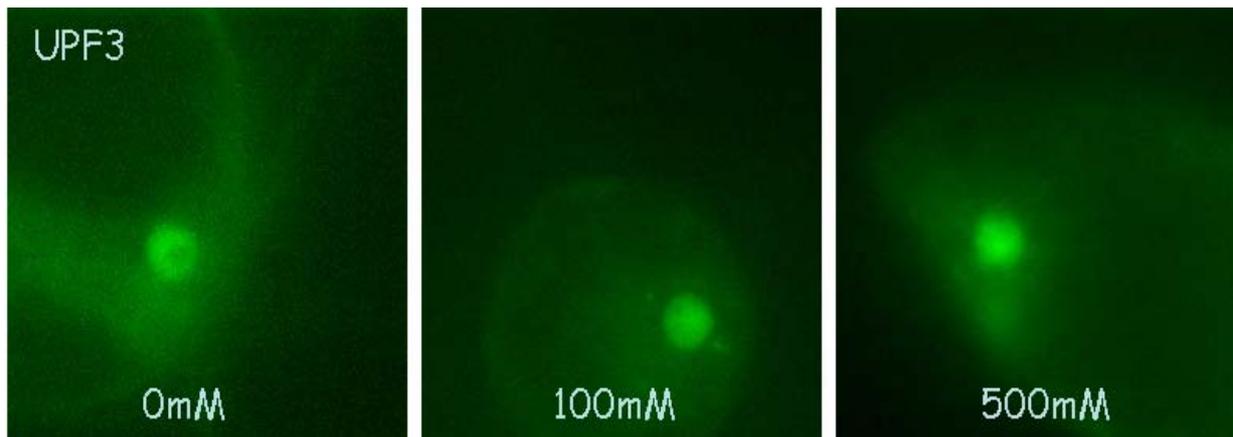


Fig. 61: Dinámica de la proteína UPF3 en presencia de NaCl. Observación “in vivo” de la fusión entre GFP y UPF3 con diferentes concentraciones de NaCl.

Con todos estos datos, podemos afirmar que el movimiento de una proteína como RCY1, durante estrés salino, no es ni único ni generalizado, con respuesta a otras proteínas, pero sí es especial, ya que hay que recordar que se detectaba cierta movilidad con 10mM de NaCl, una concentración muy baja en comparación con otras proteínas móviles.

Es por todo esto, que la movilidad de RCY1 durante el estrés salino, y el bajo límite de detección que posee al entrar la sal, puedan ser claves en la tolerancia a sal que provoca su sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana* (Ver apartado 5.4).

4.7.3 MOVILIDAD DE LOS CUERPOS DE CAJAL EN PLANTAS SOBREENPRESANDO RCY1

Debido a la posibilidad de que RCY1 pueda localizarse en los cuerpos de Cajal (Ver apartado 5.6) (Dickinson et al., 2002), se decidió observar si los Cuerpos de Cajal, representados por la proteína U2B, eran anómalos o tenían una dinámica especial, en plantas que sobreexpresaban RCY1.

Esto se realizó gracias a la técnica de inmunolocalización (Ver apartado 3.7.1), usando como anticuerpo primario el anti-U2B (obtenido en conejo) y como secundario un “anti-rabbit” (marcado con fitocromo C), ambos cedidos por el Dr. Peter Shaw.

El ensayo consistió en detectar por esta técnica la proteína U2B, definitoria de cuerpos de Cajal, en plantas silvestres y en plantas con la inserción del 35S::RCY1 (Ver apartado 5.4). También se hicieron tratamientos con NaCl de ambas y se comparó la dinámica.

El primer resultado obtenido fue que las líneas sobreexpresando RCY1 no poseen ninguna anomalía en cuanto a la disposición o número de los cuerpos de Cajal (Ver figura 62), que deben estar en número inferior a 3 y cerca del nucleolo, que en esta misma figura es la parte central oscura del núcleo, donde U2B no posee presencia.

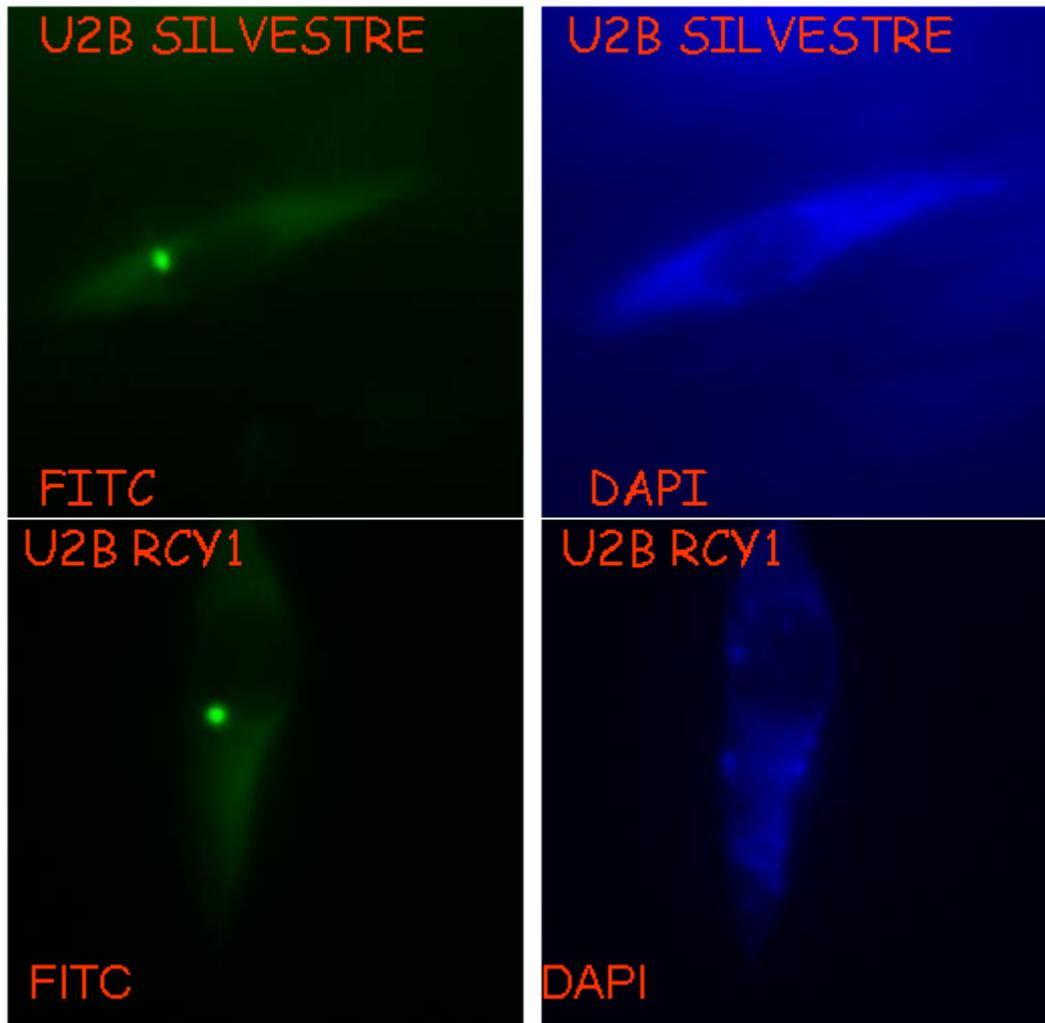


Fig. 62: Movilidad de los cuerpos de cajal en plantas sobreexpresando RCY1. Observación de U2B gracias a la fluorescencia del fitocromo C. De derecha a izquierda observamos, U2B en plantas silvestres, tinción DAPI de cromatina de plantas silvestres, U2B en plantas sobreexpresando RCY1 y tinción DAPI de estas últimas.

Tampoco se observa ninguna anomalía en la estructura cromatínica, por lo que se deduce que es muy probable que RCY1 no afecte ni a los cuerpos de Cajal, ni a la estructura de la cromatina, al menos en condiciones no estresantes.

Posteriormente, se realizó el mismo inmunoensayo, pero habiendo tratado previamente las plántulas con 250mM de NaCl, durante 1 día y en placa.

El resultado fue también negativo, y no se observaron variaciones ni en las plantas silvestres, ni en las transgénicas, de la disposición de U2B (Ver figura 63).

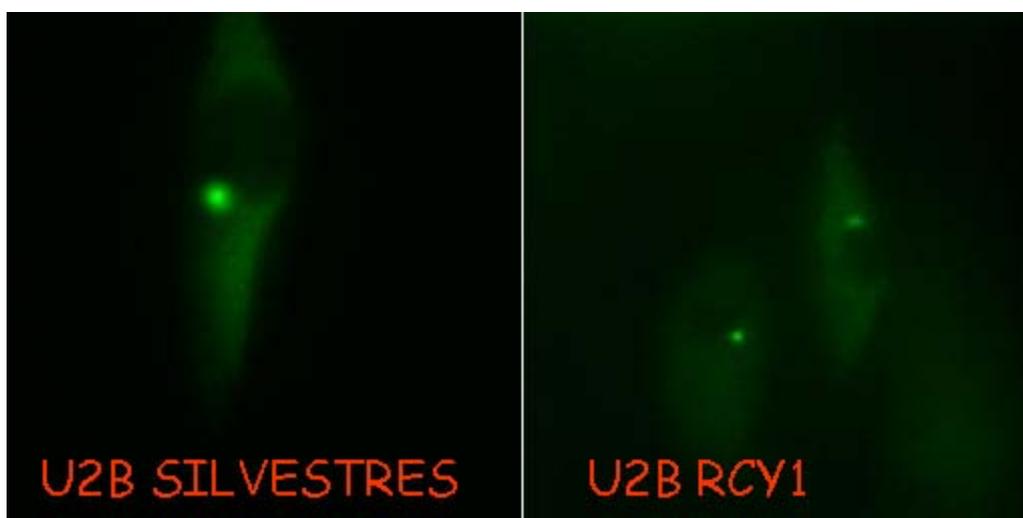


Fig. 63: Movilidad de los cuerpos de cajal en plantas sobreexpresando *RCY1*. Observación de U2B gracias a la fluorescencia del fitocromo C, en plantas silvestres (Izquierda) y sobreexpresando *RCY1*.

Estos datos confirman también que al igual que ocurría con la técnica de fusiones (Ver apartado 5.7.2), la disposición espacial de U2B, no varía con los tratamientos salinos.

Por tanto, de todos estos datos se deduce, al menos en lo que respecta a U2B, que la sobreexpresión de la proteína de estudio no altera el patrón de los cuerpos de Cajal, ni en condiciones normales, ni estresantes. Por todo esto, la respuesta a estrés mediada por *RCY1* parece no implicar a estos orgánulos nucleares, y nos proporciona una reducción en el ámbito de estudio de la tolerancia a sal.

4.8 PROTECCIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN “In Vitro” FRENTE A NaCl, MEDIADA POR *RCY1*

Existen pruebas acerca de la implicación de *RCY1* en splicing y en transcripción de células humanas (Ver introducción). En plantas, desgraciadamente, no es posible aún realizar un ensayo de splicing totalmente “in Vitro”, por lo que a la hora de testar si hay protección de alguna proteína frente a sal, estaríamos observando un fenómeno general de tolerancia a sal de toda la célula, es decir, si observamos que existe menos cantidad de intrones en el mRNA maduro en presencia de la proteína de estudio, podríamos estar observando que la

planta en general tolera la sal y eso provoca un mejor funcionamiento del splicing. Así por tanto, si la tolerancia fuera debida a otro proceso, la célula soportaría mejor la sal y toda su maquinaria incluido el splicing, funcionaría mejor. Como ejemplo podría servirnos un gen cuya sobreexpresión provocara un mejor transporte de mRNA en presencia de NaCl. Así, al probar si en las plantas sobreexpresando este gen funciona mejor el splicing, obtendríamos una respuesta positiva, y es que este mejor funcionamiento general del transporte de mRNA, provocaría que todos los demás procesos, funcionen mejor incluido el splicing.

Todos estos problemas se podrían evitar si se pudiera realizar una prueba “in Vitro” donde se aislara el splicing de los demás procesos, pero como ya se ha explicado, en plantas aún no es posible, por lo que para el caso de RCY1 se decidió no realizar ningún ensayo “in Vivo” de splicing. Pese a todo esto, y como indican los datos en humanos, se asumió que RCY1 si tiene un papel importante en el splicing y este pudiera ser el mecanismo de tolerancia.

Distinto es el caso de la transcripción “in Vitro” en plantas, ya que ésta sí es posible. Para su realización, en primer lugar se procede aislando y purificando el núcleo del resto de la célula. Con este paso se eliminan los procesos de transporte y traducción de mRNA, así como el de splicing que no funciona en esta clase de ensayos, eliminándose también los procesos físicos de exclusión de iones por la membrana nuclear. En segundo lugar se realiza el proceso de transcripción en sentido estricto.

Concretamente, en este experimento, se extrajo núcleos de células provenientes de tejido adulto de plantas silvestres y sobreexpresando *RCY1* (Ver apartado 5.4). Más tarde se realizó la prueba de transcripción, pero añadiendo distintas concentraciones de NaCl en alguno de los ensayos. El gen utilizado como testigo de transcripción fue la *Actina 2*, gen constitutivo (An et al., 1996) no relacionado aparentemente con el estrés ni con *RCY1*. Este gen fue fusionado al promotor 35S por el método de clonación por enzimas de restricción, usando como vector el plásmido pBI121 al que previamente se le había delecionado el gen *GUS*. Los cebadores utilizados fueron ACT2-F1 y ACT2-R1.

Así, se procedió mezclando los extractos nucleares con el plásmido y una concentración determinada de sal. A todo ello se le añadía la mezcla de transcripción “in Vitro” y el mRNA resultante era sometido a RT-PCR.

Con esto se pretendía observar en primer lugar, si el NaCl es capaz de inhibir la transcripción “in Vitro”, y en segundo lugar, si las plantas sobreexpresando *RCY1*, son capaces de proteger frente a esta inhibición.

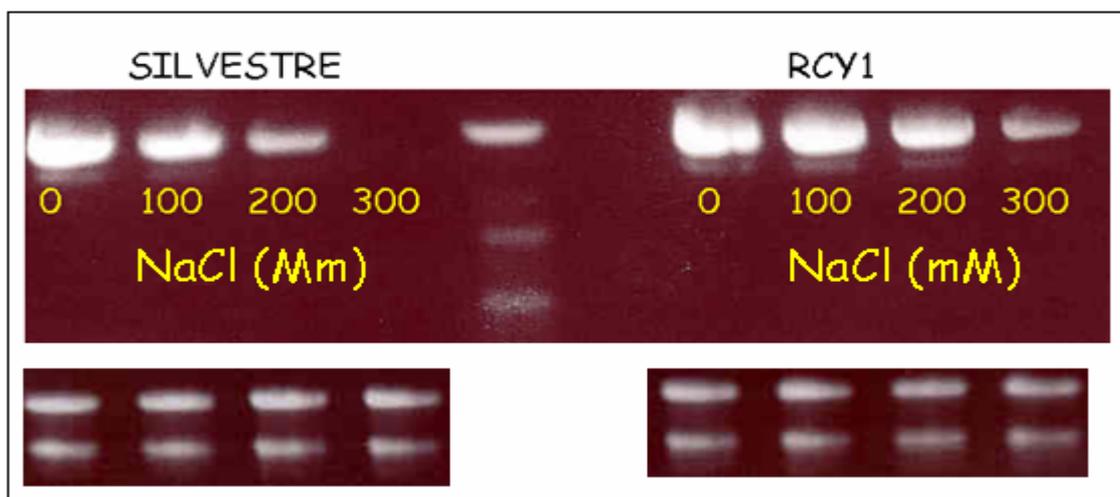


Fig. 64: Protección de la transcripción “in Vitro” frente a nacl, mediada por RCY1. Expresión de la fusión 35S::ACT2 en presencia de distintas concentraciones de NaCl, indicadas bajo cada calle en cantidad milimolar. A la izquierda se representan las bandas de plantas silvestres y a la derecha las de plantas sobreexpresando RCY1. En la parte inferior se muestran los controles de carga de RNA.

Como el DNA de la actina corresponde a cDNA, aparece una única banda que encaja en tamaño con el tamaño esperado (2400 pb). Esta banda corresponde a la cantidad de mRNA de actina 2 transcrito por la polimerasa endógena en presencia de mayor o menor concentración de NaCl.

Por tanto, se observa (Ver figura 64) que tanto en plantas silvestres como en transgénicas, la sal inhibe el proceso, manifestándose en menor cantidad del gen testigo transcrito. La RT-PCR es una técnica semicuantitativa y sirve para comparar situaciones, es decir, no podemos decir que no haya transcripción con 300mM de NaCl y en plantas silvestres, solamente que hay menos que con 200mM.

También observamos que hay más transcripción del gen testigo con 300mM de sal en plantas sobreexpresando RCY1, que en las silvestres, lo que nos indica que la mayor presencia de el gen de estudio protege el proceso de transcripción frente a la sal. Teniendo en cuenta que esta proteína interacciona con la RNA polimerasa II (Ver introducción), podemos deducir que RCY1 interviene de forma activa en algún momento de la transcripción, pudiendo ser el efecto protector frente a sal de tipo directo, si su principal función fisiológica es esta, o indirecto, si la protección es un proceso colateral.

Por tanto, y contradiciendo lo que a priori se podía esperar, de que la expresión de un gen fusionado a un promotor al que no le afecta la sal, fuera constante nos encontramos con un resultado distinto. Es cierto que el promotor 35S no se ve afectado por la sal en situaciones fisiológicas, ya que en una célula vegetal nunca se llegaría a tal concentración salina pero en este caso se ha creado una situación artificial que pretende medir, no la eficiencia de un promotor para promover la transcripción, sino que se pretende comprobar el funcionamiento general de las enzimas encargadas de realizar este proceso, obteniéndose por tanto una inhibición por sal de la transcripción.

5-DISCUSIÓN

5.1 EXPRESIÓN DE *RCY1*.

5.1.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN.

Es importante conocer cual es la expresión de un gen para poder intentar inferir un posible mecanismo de acción o un posible patrón de implicación de un gen en determinados procesos.

Un primer aspecto a conocer es el del nivel de expresión basal, pudiéndose así distinguir entre genes ubicuos en toda la planta, o genes que sólo se expresan en determinados tejidos o situaciones. *RCY1* ha demostrado ser un gen con una baja aunque existente expresión basal, detectándose incluso en todos los órganos principales. Por esto parece que posee determinada relevancia en la fisiología de la planta, ya que siempre se expresa. Esta importancia queda en relieve si centramos nuestra atención en otros organismos. Así en humanos parece ser un gen importante en la vida celular, viéndose implicado en procesos de apoptosis (Yang et al., 2003) y siendo utilizada como candidata a oncogen, (Redon et al., 2002). Detectada su expresión en todos los tejidos, y con distintas variantes de splicing (de Graaf et al., 2003), parece que su acción destaque en zonas implicadas en la reproducción, factor que concuerda con el aumento de la expresión general en flores de *Arabidopsis thaliana*, llevándonos a pensar que no sólo su estructura proteica se ha conservado a lo largo de la evolución, como nos indican los datos del BLAST, sino que este gen pudiera haber conservado su función.

En humanos, la proteína codificada, puede poseer sólo el dominio ciclina y ser funcional en la zona testicular (de Graaf et al., 2003), hecho que no ocurre en *Arabidopsis thaliana*, en donde sólo se ha encontrado la proteína entera con sus dos dominios. Teniendo en cuenta la diferente fisiología de la reproducción de ambos organismos, cabe pensar que el dominio RS juegue un papel importante en el proceso de reproducción tanto en la planta, como en humanos, pudiendo ser distintos los procesos donde actúe este gen en cada caso.

Pero la expresión de este gen se dispara al realizar una serie de tratamientos estresantes. Así, con tratamientos salinos de NaCl y LiCl, y tratamientos que provocan estrés hídrico, observamos un aumento en la expresión del gen, sin descartarse tampoco una mayor estabilidad del RNA mensajero.

Si tenemos en cuenta la presencia de *RCYI* en tejidos reproductivos, y la reacción de su expresión ante el estrés osmótico (salino e hídrico), podemos inferir que probablemente la presencia de *RCYI* sea importante a la hora de ayudar a estas estructuras reproductivas a aguantar el estrés osmótico que genera su desecación. Tanto polen, como estigma, como fruto, requieren, en la mayoría de casos, de la desecación para un óptimo funcionamiento (Heslop-Harrison, 1979).

Así, el polen de *Arabidopsis thaliana* debe desecarse para su correcto funcionamiento “in Vivo” (Ma, 2005; Edlund et al., 2004)). Hasta ahora las principales vías propuestas para la explicación de la tolerancia al estrés osmótico del polen, habían sido, la respuesta mediada por ABA (Meurs et al., 1992) y la acumulación de carbohidratos que actúan de solutos compatibles (Still et al., 1994). Teniendo en cuenta que no se han detectado alteraciones en la expresión de *RCYI*, durante tratamientos con ABA, pensamos que la respuesta a estrés osmótico mediada por este gen es independiente de esta hormona, por lo presentamos un nuevo factor de tolerancia a desecación de estos tejidos “in Vivo”.

No hubo respuesta de la expresión, tampoco, ante otras hormonas que se han relacionado con el estrés, como etileno, jasmónico o salicílico, por lo que la respuesta de *RCYI* también ha de ser independiente de estas hormonas. Si hubo respuesta ante el estrés causado por sorbitol, lo que reafirma la hipótesis de que la respuesta de este gen es frente a estrés osmótico en general.

Es reseñable también el leve aumento de expresión, provocado por estrés por temperatura elevada, y la no alteración de la expresión provocada por bajas temperaturas, ya que en muchas ocasiones, genes relacionados con estrés osmótico y por temperatura coinciden (Sheik-Hamad et al., 1994) debido al proceso de desecación producido por altas y bajas temperaturas.

Un comentario aparte requiere la relación entre la expresión de *RCYI* y el estrés oxidativo. Si tenemos en cuenta la inhibición de la expresión de este gen, durante tratamientos con peróxido de hidrógeno, y que la expresión de *RCYI* aumente durante tratamientos con agentes osmóticos hasta un máximo nivel, que luego desciende en forma de campana, podemos inferir que existe una posible relación inversa entre estos factores, es decir que la expresión de *RCYI* se vea afectada negativamente frente al estrés oxidativo. Es decir, en etapas tardías del estrés salino o hídrico, se produce gran presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS), que causan un gran estrés oxidativo (Zhu, 2002; Morán et al., 1994). Así, podemos decir que el descenso en la expresión de *RCYI* en los últimos días del tratamiento, podría ser debido, no solo al descenso general de la transcripción o aumento de la degradación de RNA, como se propone en resultados, sino que podría ser debido al efecto

negativo del estrés oxidativo en la expresión de *RCY1*. Todo esto nos hace proponer que la respuesta de este gen frente al estrés osmótico general sea de tipo temprano, no viéndose implicada en etapas tardías, cuando el estrés oxidativo es muy potente.

5.1.2 ANÁLISIS DEL PROMOTOR

Este análisis nos permite complementar los datos obtenidos en el apartado anterior.

El primer aspecto destacado es la presencia del gen testigo tanto en polen, como en estigma y anteras. Este dato corrobora la hipótesis de la relación entre estructuras que deben desecarse, con *RCY1*, y es que no aparece en otro tejido de la planta de forma tan abundante salvo en estos tres y en un mínimo porcentaje de hojas, que se suponen las más castigadas por el estrés hídrico. Así, ya podemos afirmar con mayor rotundidad la candidatura de este gen a la protección de estas estructuras frente a su desecación fisiológica. Y es que el ejemplo propuesto para el caso del polen en el apartado anterior, también se cumple para antera y estigma, las otras dos estructuras donde más se expresa.

La antera necesita de esa desecación para una correcta dehiscencia del polen en la mayoría de las plantas (Bonner and Dickinson, 1989; Matsui et al., 1999). También el estigma, al menos de *Arabidopsis*, requiere este proceso para un correcto reconocimiento del polen estigma

No podemos encontrar esta masiva expresión en la otra estructura donde la desecación es fundamental: las semillas. La razón de esto es desconocida, aunque una explicación posible sea que *RCY1* confiere tolerancia a sal y sequía de manera secundaria, es decir, el dominio ciclina es necesario en las nombradas estructuras por tener alguna función reproductiva, y el dominio RS le acompaña confiriendo la tolerancia, pero esta función no es necesaria en la semilla y otros genes otorgan una mayor eficiencia a la hora de la tolerancia a desecación.

El segundo aspecto reseñable en este apartado es que los tratamientos salinos y de sequía promueven la expresión del gen testigo gracias al promotor, lo que descartaría en principio que la mayor presencia de mRNA en los ensayos Northern y RT-PCR, durante estos estreses, sea provocada por una mayor estabilidad del mensajero de *RCY1*. Aunque puede que los efectos de ambos mecanismos (Aumentos de expresión y estabilidad) sean sumatorios, está claro que el factor principal es el aumento de la expresión.

5.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE *RCY1* POR SOBREEXPRESIÓN Y CON MUTANTES EN *Arabidopsis thaliana*

5.2.1 SOBREEXPRESIÓN EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*

El uso de la sobreexpresión de un gen en una planta transgénica, nos permite conocer más la función fisiológica del gen sobreexpresado, ya que su función en general se verá amplificada.

En el caso de *RCY1*, la sobreexpresión en *Arabidopsis* se llevó a cabo para comprobar si existía también un efecto de protección frente a estrés salino, como ocurría en levaduras (Forment et al., 2002). En este aspecto no hubo sorpresas comprobándose esta hipótesis inicial. Lo que sorprendió más quizá es la gran tolerancia que confiere a sequía este gen, incluso pudiendo ser denominada resistencia, ya que las plantas adultas en ausencia de riego se comportan de forma casi normal.

Por tanto, lo que en levaduras no se pudo corroborar, que *RCY1* confirmara tolerancia a estrés hídrico, si se pudo comprobar en plantas, tomando mayor fuerza si cabe la hipótesis nombrada en apartados anteriores de que este gen es importante en el proceso biológico de la desecación de estructuras reproductivas. Es decir, *RCY1* se expresa de manera basal y en gran cantidad en anteras, polen y estigma cuando éstos empiezan a necesitar de su desecación para su correcto funcionamiento, pero no se expresa en el resto de la planta de *Arabidopsis*, probablemente debido a temas de economía celular, es decir ya que esta planta no vive en condiciones normales en suelos salinos o secos, se prima la expresión de proteínas más útiles. Pero al sobreexpresarla de forma artificial, todo este poder de protección frente a sal y sequía se otorga también al resto de la planta, observándose llamativos y elevados índices de crecimiento de las transgénicas, durante estos estreses.

Es complicado poder comparar el efecto de la sobreexpresión de varios genes con respecto a la tolerancia a estrés que provocan cada uno por separado, pero el efecto provocado por *RCY1* al ser sobreexpresado es sin duda muy positivo frente a la salinidad y sobre todo para la sequía. Siguiendo la clasificación propuesta por Greenway y Munns en 1980, las plantas de *Arabidopsis* sobreexpresando este gen estarían clasificadas en el área de las tolerantes a sal y sequía (Ver Introducción).

5.2.2 MUTANTE K.O. PARA *RCY1*

Al crecer una planta que carece de algún gen concreto por el método de las inserciones de T-DNA, podemos encontrarnos en varias situaciones distintas. La primera, en la que la mutación sea letal porque la expresión del gen es fundamental para la planta, y sin el la planta no se puede desarrollar. Una segunda situación ocurriría al no observarse ningún fenotipo en la planta mutante, debido a la escasa importancia del gen en la vida de la planta, o principalmente que la función del gen truncado sea suplido por otro gen redundante. El tercer caso y quizá el menos frecuente es el caso en el que encontramos un fenotipo concreto en el mutante, ya sea morfológicamente o por respuesta a sustancias fitoquímicas. La cuarta ocurriría cuando la mutación se convierte en deletérea para la reproducción de la planta, es decir la mutación no es letal, pero sí afecta al sistema reproductivo de la planta, por lo que esta no se puede reproducir y la mutación no se transmite.

El caso del mutante K.O. para *RCY1* se encuentra en la cuarta situación definida, ya que no se puede reproducir en homocigosis, pero también en la tercera, ya que fenotípicamente no posee polen, factor que se puede comprobar a simple vista.

El por qué de esta carencia polínica es de fácil explicación si tenemos en cuenta los parámetros aportados en apartados anteriores de esta discusión. El polen no llega a formarse correctamente porque *RCY1* es importante para la desecación de estructuras reproductivas como la antera, y como ya se ha nombrado, sin desecación de la antera la maduración y dehiscencia del polen no es correcta. Lo que no conocíamos hasta este momento es que no sólo es importante, sino que es esencial, ya que sin él no hay polen y por tanto autofecundación.

Si debe ser importante aunque no esencial en el proceso de desecación del estigma para el posterior reconocimiento polen-estigma, ya que si fecundamos con polen silvestre obtenemos semillas viables totalmente.

En todos los demás aspectos, ya sean morfológicos, o de respuesta a otras sustancias, no hay diferencias entre el mutante y el silvestre, por lo que puede que haya redundancia o que *RCY1* sólo actúe en el proceso de desecación de estas estructuras.

En resumen, no hay redundancia génica en lo que respecta a anteras y polen, pero sí en el estigma.

Hay que destacar también el hecho de que este mutante no sea más sensible a sal, lo que nos indica que el papel de *RCY1* en la tolerancia a sal y de forma general es inexistente, apareciendo sólo en las estructuras nombradas.

5.3 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE RCY1

El conocimiento de la localización subcelular de cualquier proteína nos permite conocer su función de manera más precisa debido a la enorme compartimentalización celular. Así, no se podrá afirmar con rotundidad que una proteína posee una determinada función por su sublocalización, pero el conocimiento de este factor nos permitirá afinar mucho en este aspecto, y sobretodo descartar determinados procesos que no se producen en el lugar celular donde habita la proteína en cuestión. A todo esto, hay que sumar el poco conocimiento que se posee en este momento de determinados compartimentos celulares, por lo que nuevas funciones de determinados habitáculos celulares pudieran aparecer con mucha probabilidad.

Siguiendo este planteamiento, es muy probable que RCY1 sea una proteína relacionada con el procesamiento del RNA en cualquiera de sus pasos. Esto es debido a la localización nuclear, y más concretamente a la localización de RCY1 en el nucleolo y cuerpos nucleares.

Como ya se ha comentado en estos compartimentos se localizan las proteínas encargadas del procesamiento de RNA.

Por tanto, y comenzando con la lista de posibles funciones, RCY1 podría estar implicada en el proceso de síntesis de RNA ribosómico, debido a su localización nucleolar. Se conoce la asociación de esta proteína con la RNA polimerasa II en humanos, pero nada se sabe de su posible interacción con la RNA polimerasa I en plantas, enzima encargada de la síntesis de los RNA ribosómicos (excluyendo el 5S). Pero en este orgánulo, también podemos encontrar parte de la RNA polimerasa II (Oakes et al., 1993) y aunque no es seguro que esta activa en esta posición nucleolar, si puede que este sea un primer contacto entre la RNA polimerasa II y RCY1.

Siguiendo con la lista de posibles funciones hay que destacar la importancia de ciertas proteínas del nucleolo en el transporte del RNA (Sidebottom and Harris, 1969), en las que se podría encontrar RCY1, aunque esta hipótesis queda en parte descartada si hablamos de transporte al citoplasma, ya que en ningún momento se observa la presencia de esta proteína en él. Pero esta hipótesis si toma cierta importancia si observamos la movilidad de RCY1 ante situaciones de estrés, y siempre en el interior del núcleo. Así, RCY1 podría desplazarse junto al RNA, no directamente, ya que no posee ningún dominio de unión a éste, pero si unida a cualquier otra proteína. Aunque puede que su desplazamiento se realice de forma individual, o unida a otras proteínas, libres de RNA.

La otra localización principal, los cuerpos nucleares, nos marcan dos funciones posibles más. Volviendo a la RNA polimerasa II, cuya localización, física y funcional, si coincide con la de los cuerpos nucleares, podemos encontrar una relación interesante entre esta enzima y RCY1. Y es que RCY1 se une al dominio CTD de la RNA polimerasa II cuando esta hiperfosforilado, al igual que muchas proteínas encargadas del procesamiento del RNA (Carty and Greenlaf, 2002). Pero es que este dominio se fosforila masivamente en situaciones de estrés (Palancade and Bensusade, 2003; Bonnet et al., 1999)), al igual que conocemos por el presente trabajo que la expresión génica de *RCY1* aumenta, por lo que intuimos que su cantidad proteica será también superior. Por tanto, es muy probable que en situaciones de estrés, estas dos proteínas tengan una elevada probabilidad de interactuar, hecho al que debemos sumar la dinámica de RCY1 en condiciones de estrés salino. Es decir, hemos podido demostrar que RCY1 es una proteína móvil y de reacción inmediata ante este estrés. La movilidad se produce del nucleolo, donde predomina de forma mayoritaria la RNA polimerasa I, a zonas donde la RNA polimerasa predominante es la de tipo II, por tanto, la probabilidad de interacción entre ambas proteínas aumenta.

Esta dinámica de RCY1, también nos permite pensar que en condiciones de estrés salino, quedará situada más cerca físicamente de proteínas de splicing, por lo que su interacción con ellas también será más probable, siempre gracias a su dominio RS, dominio de unión con otras proteínas, sobretodo con un dominio similar.

Pero transcripción y splicing están asociados (Reed, 2003), debido al ahorro energético que produce esto en la célula, que no deberá transportar los transcritos al lugar de procesamiento de intrones. Se conoce también que son ciertas proteínas SR las que se encargan de este acoplamiento (Bentley, 1999), aunque nada se conoce acerca de este mecanismo en situaciones de estrés. Todo esto nos ha llevado a pensar que RCY1 puede ser clave en este acoplamiento de procesos durante el estrés, teniendo en cuenta que a su vez podría actuar internamente en los procesos que trata de acoplar.

5.4 POSIBLE MECANISMO DE FUNCIONAMIENTO DE RCY1

Conociendo los datos de que RCY1 se colocaliza con la RNA polimerasa II y que es capaz de interactuar con el dominio CTD hiperfosforilado de ésta enzima, sólo nos queda por conocer si la funcionalidad de ambas proteínas puede cruzarse, al menos en situaciones de estrés salino. Para esto se diseñó el experimento de transcripción “in Vitro”, con el que se

consiguieron unos resultados claros a este respecto. Así, se puede afirmar que la sobreexpresión de RCY1 provoca una mayor tolerancia de la polimerasa II a estrés salino. Una posible explicación sería la de que al interactuar ambas proteínas, la RNA polimerasa II, obtuviera una mayor estabilidad, o más probablemente, el dominio RS al interactuar con esta enzima alejara literalmente los cationes tóxicos Na^+ , debido a su elevado punto isoeléctrico. Por tanto, al tener el dominio RS tantos residuos cargados positivamente, y al estar unidas las dos proteínas, se produciría simplemente un efecto físico de repulsión iónica que alejaría los cationes del centro activo de la enzima, para el cual resultarían muy tóxicos.

Esta hipótesis explicaría en parte el hecho de que sólo algunas proteínas RS sobreexpresadas otorgaran tolerancia a sal. Es decir, recordemos que sólo se pudieron aislar 2 genes de este tipo de proteínas, cuya sobreexpresión confería tolerancia a sal en levaduras, y que por tanto el mecanismo de tolerancia es funcional y no por el simple hecho de poseer un dominio RS. Por tanto, puede que estos dos genes aislados, SRL1 y RCY1, confieran tolerancia por su capacidad de interactuar con la RNA polimerasa II, y que otras proteínas SR no lo puedan hacer, o simplemente si su punto isoeléctrico no es suficientemente alto como para repeler cationes.

Y es que pudiera ocurrir que estas proteínas RCY1 y SRL1, fueran homólogos funcionales de otras proteínas de procesamiento de RNA, pero actuaran en situaciones de estrés osmótico fisiológico, es decir, en condiciones normales, la planta fabricaría otras proteínas SR para el procesamiento, pero en condiciones de estrés, puede que se sustituyan por RCY1 y SRL1 entre otras, con lo que la planta lograría un mayor aprovechamiento de recursos y tolerancia a estrés. Así, y como ocurre con las proteínas LEA que se acumulan en la etapa de embriogénesis, probablemente por su alto poder hidrofílico, pero poseen funciones homólogas a cualquier proteína propia de estados no estresantes (Wise and Tunnacliffe, 2002), podría ocurrir que estas proteínas se expresasen en momentos de deshidratación controlada, como en anteras, polen o estigmas, o de estrés osmótico en general. Así estas proteínas cumplirían con su función normal y protegerían a la vez a la planta de un estrés salino o hídrico simultáneamente.

Por tanto, y teniendo en cuenta todos estos datos, se procederá a un resumen general de la propuesta de funcionamiento de RCY1.

El funcionamiento de RCY1 comenzaría con un aumento de expresión génica al detectarse el estrés, ya sea salino o hídrico, aunque puede que en vivo se exprese también en antera, polen y estigma antes del estrés debido a la presencia en el promotor de secuencias específicas para estos tejidos, como las secuencias tipo LAT52 localizadas en la región

promotora. Este aumento de expresión en principio sería ABA independiente, y nada se conoce acerca de los mensajeros que podrían estar implicados.

Teóricamente, este aumento en el mRNA provocaría un aumento de la cantidad de proteína total de este gen. Rápidamente y gracias al dominio RS, la proteína se colocaría en el nucleolo y cuerpos nucleares. Hay que indicar que de forma basal aunque en muy poca cantidad también hay expresión de RCY1 en todos los tejidos, existiendo proteínas en los nucleolos y cuerpos nucleares de todas las células de la planta.

Así, por tanto, si el estrés salino u osmótico que ha provocado el aumento de expresión persiste, la proteína localizada en estos orgánulos comenzará a ocupar todo el nucleoplasma y a interactuar con la RNA polimerasa II, estabilizándola o repeliendo los cationes tóxicos entrantes o acumulados por deshidratación, pero siempre provocando como resultado un mejor funcionamiento de esta enzima. Paralelamente puede que ayude a esta enzima también a colocarse con los factores de splicing, mejorando el proceso de acoplamiento de ambos procesos en situaciones de estrés. También puede que estimule el proceso de splicing, que ya de por sí está dañado debido a los efectos del estrés.

El resultado de este proceso lo podemos encontrar en que tanto el estigma como el polen sufren un proceso de deshidratación fisiológica, recuperándose después para poder reproducir a la planta. Este mantenimiento vital de las células en situaciones de deshidratación puede ser debido a la acción de proteínas como RCY1, que también ayudarán a la célula vegetal a mantenerse en condiciones de estrés salino u osmótico en otros órganos y gracias en teoría a este mecanismo propuesto.

6-CONCLUSIONES

- *RCY1* tiene en general una expresión basal (sin ningún tratamiento) muy baja. Esta expresión aumenta de forma considerable al realizar tratamientos estresantes con NaCl, LiCl, ausencia de riego y sorbitol. En el caso de los tratamientos con las sales anteriormente nombradas, el aumento de expresión se produce tanto al aumentar la concentración de sal, como al realizar una cinética a concentración constante. Estos factores nos indican que *RCY1* es un buen candidato para estar implicado en los mecanismos de respuesta frente a estrés salino (tanto a su componente tóxico como a su componente osmótico) e hídrico.
- Ninguna de las fitohormonas con las que se ha trabajado (todas las que en teoría están relacionadas con el estrés), ha resultado tener efectos sobre la expresión de *RCY1*. Cabe destacar la ausencia de efecto provocado por el ácido Abscísico, una de las hormonas principales en la respuesta a estrés salino. Es por esto que a priori podemos calificar la acción de *RCY1* en la respuesta a estrés como ABA independiente.
- Donde sí aparece una expresión basal elevada de *RCY1* es en anteras, polen y estigma. Estas estructuras necesitan de una desecación fisiológica y posterior recuperación, para su correcto funcionamiento, y es en este proceso donde presuntamente puede intervenir el gen de estudio. Es decir, *RCY1* actuaría como proteína vicariante de otras proteínas relacionadas con el procesamiento de mRNA en esta situación de desecación. Así, la planta lograría una mayor tasa de supervivencia de estas células durante dicho estrés.
- La sobreexpresión de *RCY1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* les otorga a dichas plantas cierta tolerancia frente a situaciones de estrés salino (NaCl y LiCl) e hídrico (ausencia de riego), lo que provoca que estas plantas tengan una mayor facilidad para el crecimiento y desarrollo reproductivo en estas situaciones estresantes, en comparación con las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Este hecho confirma definitivamente la implicación de este gen en la respuesta a estrés salino e hídrico.
- La ausencia de *RCY1* en plantas mutantes “knock out” provoca, en homocigosis, esterilidad masculina, es decir, las plantas sin ningún tipo de expresión de este gen carecen de polen maduro. Este hecho no viene si no a confirmar que el gen de estudio está implicado en la formación o maduración de estructuras que necesitan desecación

fisiológica, como en este caso es la antera y el polen. Así, puede que al no aparecer *RCY1*, las células de las anteras no sobrevivan a la desecación necesaria para formar el polen maduro y mueran.

- La proteína codificada por *RCY1* se localiza en el nucleolo y algunos cuerpos nucleares. Pero esta conformación se ve alterada al tratar con cantidades muy bajas de sal (10mM NaCl). Es en esta situación cuando la proteína se deslocaliza hacia ocupar parte del nucleoplasma. Esta situación no es exclusiva de *RCY1*, pero sí a concentraciones tan bajas, donde ninguna otra proteína nuclear testada reaccionaba ante tan exigua cantidad de sal. Esto nos indica la alta sensibilidad de *RCY1* a sal, y nos da una prueba más de su implicación en el procesamiento de mRNA. Así, puede que *RCY1* se almacene en el nucleolo (como ocurre con otras proteínas) y no sea hasta los primeros momentos del estrés cuando comience a desplazarse para ocupar los lugares donde va a desempeñar su función, en teoría cerca de la RNA polimerasa II, teniendo en cuenta los datos en humanos.
- Existe cierta protección de *RCY1* frente al estrés salino (NaCl) durante la transcripción, al menos durante la transcripción “in Vitro”. Puede que después de desplazarse del nucleolo al nucleoplasma, se acerque a la RNA polimerasa II, protegiéndola de la acción de las sales, o simplemente mejorando las interacciones con otras proteínas que se necesitan para el correcto funcionamiento de la transcripción.

7-BIBLIOGRAFÍA

Abbott J, Marzluff WF, Gall JG. (1999)

The stem loop binding protein (SLBP1) is present in coiled bodies of the *Xenopus* germinal vesicle.

Mol. Biol. Cell 10: 487–99

Abler ML, Green PJ (1996)

Control of mRNA stability in higher plants.

Plant Mol Biol. 32(1-2):63-78

Allakhverdiev SI, Nishiyama Y, Miyairi S, Yamamoto H, Inagaki N, Kanesaki Y, and Murata N (2002)

Salt Stress Inhibits the Repair of Photodamaged Photosystem II by Suppressing the Transcription and Translation of *psbA* Genes in *Synechocystis*1

Plant Physiol, Vol. 130, pp. 1443-1453

Ali GS, Golovkin M and Reddy ASN (2003)

Nuclear localization and in vivo dynamics of a plantspecific serine/arginine-rich protein

The Plant Journal Volume 36 Page 883

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003)

Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*

Science Vol. 301. no. 5633, pp. 653 - 657

Ahmad I, Larher F, Stewart GR (1979)

Sorbitol, a Compatible Osmotic Solute in *Plantago maritima*

New Phytologist, Vol. 82, No. 3 , pp. 671-678

An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB (1996)

Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues

The Plant Journal Volume 10 Page 107

Andersson JE, Smith SD and Monson RK (1997)

Physiological ecology of North American Desert Plants

Springer Books

Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2002)

Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals..

Bioinformatics. Feb;18(2):298-305.

Bartoli G, Simontacchi M, Tambussi E, Belgrano J, Montaldi E and Puntarulo S (1999)

Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves

Journal of Experimental Botany, Vol 50, 373-381,

Bent,A.F. (2000).

Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species.

Plant Physiol., 124: 1540-1547.

Bentley D (1999)

Coupling RNA polymerase II transcription with pre-Mrna processing

Current Opinion in Cell Biology 1999, 11:347–351

Bethke PC and Drew MC (1992)

Stomatal and Nonstomatal Components to Inhibition of Photosynthesis in Leaves of *Capsicum annuum* during Progressive Exposure to NaCl Salinity

Plant Physiology 99:219-226

Betz,F.S., Hammond,B.G. & Fuchs,R.L. (2000).

Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests.

Regul. Toxicol. Pharmacol., 32: 156-173.

Beven AF, Simpson GG, Brown JWS, Shaw PJ (1995)

The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants.

J. Cell Sci. 108: 509– 18

Birney,E., Kumar,S. & Krainer,A.R. (1993).

Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors.

Nucleic Acids Res., 21: 5803-5816.

Blencowe, B.J., J.A. Nickerson, R. Issner, S. Penman, and P.A. Sharp (1994)

Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes.

J. Cell Biol. 127:593–607.

Blencowe, B.J., R. Issner, J. Kim, P. McCaw, and P.A. Sharp. (1995)

New proteins related to the Ser-Arg family of splicing factors.

RNA. 1:852–865.

Blencowe,B.J., Bowman,J.A., McCracken,S. & Rosonina,E. (1999).

SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors.

Biochem. Cell Biol., 77: 277-291.

Bohnert HJ, Ayoubi P, Borchert C, Bressan RA et al. and Zhu JK (2001)

A genomics approach towards salt stress tolerance

Plant Physiol. Biochem. 39 295–311

Bonner LJ and Dickinson HG (1989)

Anther Dehiscence in *Lycopersicon esculentum* Mill. I. Structural Aspects

New Phytologist, Vol. 113, No. 1 pp. 97-115

Bonnet F, Vigneron M, Bensaude O and Dubois MF (1999)

Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C- terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2)

Nucleic Acids Research, Vol 27, Issue 22 4399-4404

Boudonck K, Dolan L, Shaw PJ (1998)

Coiled body numbers in the *Arabidopsis* root epidermis are regulated by cell type, developmental stage and cell cycle parameters.

J. Cell Sci. 111: 3687–94

Boudonck K, Dolan L, Shaw PJ (1999)

The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein.

Mol. Biol. Cell 10: 2297–307

Bray EA. (1993)

Molecular responses to water deficit.

Plant Physiol. 103: 1035–40

Brown JH, Valone TJ, and Curtin CG (1997)

Ecology Reorganization of an arid ecosystem in response to recent climate change

Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 9729-9733, September 1997

Cáceres, J.F. & Krainer, A.R. (1993).

Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains.

EMBO J., 12: 4715-4726.

Cáceres, J.F., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L., & Krainer, A.R. (1997).

Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity.

J. Cell Bio., 138: 225-238.

Cáceres, J.F., Sreaton, G.R. & Krainer, A.R. (1998).

A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm.

Genes Dev., 12: 55-66.

Cajal SRy. (1903)

Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados.

Trab. Lab. Invest. Biol. (Madrid)

Carmo-Fonseca M, Tollervey D, Barabino SML, Merdes A, Brunner C, et al. (1991).

Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery.

EMBO J. 10: 195–206

Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho MT, Lamond AI. (1992)

Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies

J. Cell Biol. 1992.

Carty, SM and Greenleaf AL (2002)

Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing.

Mol. Cell Proteomics 1, 598–610

Chadalavada SV, Rajendrakumar CS, Suryanarayana T, Reddy AR. (1997)
DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process
FEBS Lett. Jun 30;410(2-3):201-5.

Chandler,S.D., Mayeda,A., Yeakley,J.M., Krainer,A.R. & Fu,X.D. (1997).
RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 3596-3601.

Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G. (1999)
Gemin3: a novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems.
J. Cell Biol. 147: 1181–93

Chaves MM (1991)
Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation
J. Exp. Bot.; 42: 1-16

Chazen O, Hartung W & Neumann PM (1995)
The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport.
Plant Cell and Environment **25**, 727–735.

Chiu WL, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H and Sheen J (1996)
Engineered GFP as a vital reporter in plants
Current Biology, Vol 6 No 3:325–330

Cohen,M.N. (1993).
La crisis alimentaria de la prehistoria.
Alianza Editorial, S.A. Barcelona

Colwill,K, Pawson,T., Andrews,B., Prasad,J., Manley,J.L., Bell,J.C. & Duncan,P.I. (1996).
The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution.
EMBO J., 15: 265-275.

Couia H, Chorbali MH, and Touraine B (1994)
Effects of NaCl on Flows of N and Mineral Ions and on NO₃-Reduction Rate within Whole Plants of Salt-Sensitive Bean and Salt-Tolerant Cotton
Plant Physiol. 105: 1409-1418

Cramer GR and Bowman DC (1991)
Kinetics of maize leaf elongation 1. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity.
Journal of Experimental Botany 25, 1417–1426

Cramer GR and Läuchli A (1986)
Ion activities in solution in relation to Na⁺–Ca²⁺ interactions at the plasmalemma. *Journal of Experimental Botany* 25, 321–330

Cramer GR, Epstein E and Läubli A (1988)

Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentration.

Journal of Experimental Botany 25, 1513–1522.

Cramer P, Bushnell DA, and Kornberg RD (2001)

Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution.

Science 292: 1863-76.

Curtis MD and Grossniklaus U (2003)

A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta
Plant Physiology 133:462-469

Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ. (1994)

The plasma membrane of Arabidopsisthaliana contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP.

Plant Physiol. 106:1325–33

Dauwalder,B. & Mattox,W. (1998).

Analysis of the functional specificity of RS domains in vivo.

EMBO J., 17: 6049-6060.

Davis SJ and Vierstra RD (2000)

Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants

Plant Molecular Biology 36: 521–528,

De Block,M., Botterman,J., Vandewiele,M., Dockx,J., Thoen,C., Gossele,V., Rao,V., Movva,N., Thompson,C. & Van Montagu,M. (1987).

Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J., 6: 2513-2518.

De Nadal E, Clotet J, Posas F, Serrano R, Gomez N,and Ariño J (1998)

The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p SeryThr protein phosphatase

PNAS Vol. 95, pp. 7357–7362, June

DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR,. Thompson JE, Prestwich GD, and Hama H. (2001)

Rapid Accumulation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Correlates with Calcium Mobilization in Salt-Stressed Arabidopsis

Plant Physiol, , Vol. 126, pp. 759-769

Dickinson LA, Edgars AL, Ehley J and Gottesfeld JM (2002)

Cyclin L is an RS domain protein involved in Pre-mRNA Splicing

Journal of Biological Chemistry Vol. 227 pp 25465-25473

Dichtl B, Stevens A, Tollervey D (1997)

Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes.

EMBO J. Dec 1;16(23):7184-95.

Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, Michell RH (1997)
Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis..
Nature. Nov 13; 390(6656):123-4.

Downton WJS (1977)
Photosynthesis in Salt-Stressed Grapevines
Australian Journal of Plant Physiology 4(2) 183 – 192

Drennan PM , Berjak P, Lawton JR and Pammenter NW (1987)
Ultrastructure of the salt glands of the mangrove, *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh., as indicated by the use of selective membrane staining
Planta Volume 172, Number 2 Pages: 176 – 183

Drobak BK, Watkins PA (2000)
Inositol (1,4,5)trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress.
FEBS Lett. 481: 240– 44

Eckardt NA (2001)
Luc Genetic Screen Illuminates Stress-Responsive Gene Regulation
The Plant Cell, Vol. 13, 1969-1972

Edlund AF, Swanson R and Preuss D (2004)
Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination
The Plant Cell 16:S84-S97

Edström,JE., Grampp,W. and Schor,N. (1961)
The intracellular distribution and heterogeneity of ribonucleic acid in starfish oocytes.
J. Biophys. Biochem. Cytol., **11**, 549–557.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S and Heijne Gv (2000)
Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence..
J. Mol. Biol., 300: 1005-1016,

Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelley DB, Cunningham GA, Wrona AF (1980)
Saline culture of crops: a genetic approach.
Science 210 399:404

Espartero J, Pintor-Toro JA, Pardo JM. (1994)
Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress.
Plant Mol. Biol. 25:217–27

Espinosa-Ruiz A., Bellés JM, Serrano R and Culiáñez-Macià FA (1999)
Arabidopsis thaliana AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth
The Plant Journal Volume 20 Page 529

Etheridge KT, Banik SSR, Armbruster BN, Zhu Y, Terns RM, Terns MP, and Counter CM (2002)

The Nucleolar Localization Domain of the Catalytic Subunit of Human Telomerase
J. Biol. Chem., Vol. 277, Issue 27, 24764-24770

Fan H and Sigiura M (1995)

A plant basal in vitro system supporting accurate transcription of both RNA polymerase II- and III-dependent genes: supplement of green leaf component(s) drives accurate transcription of a light-responsive rbcS gene

The EMBO Journal vol.14 no.5 pp.1024-1031,

Fernández-García N, Martínez V, Cerdá A and Carvajal M (2002)

Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions
Journal of Plant Physiology, Volume 159, Number 8, pp. 899-905(7)

Fetzer,S., Lauber,J., Will,C.L. & Lührmann,R. (1997).

The [U4/U6-U5] tri-snRNP-specific 27K protein is a novel SR protein that can be phosphorylated by the snRNP-associated protein kinase.

RNA, 3: 344-355.

Flowers TJ, Troke PF and Yeo AR (1977)

The mechanism of salt tolerance in halophytes.

Annual Review of Plant Physiology **25**, 89–121.

Flowers TJ, Hajibagheri MA, Clipson NJW (1986)

Halophytes

Quarterly Review of Biology, Vol. 61, No. 3 (Sep., 1986), pp. 313-337

Flowers TJ and Hanson JB (1969)

The Effect of Reduced Water Potential on Soybean Mitochondria

Plant physiology Vol. 44 No. 7

Frey MR, Matera AG. (1995)

Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5915– 19.

Forment J, Ángel Naranjo MA, Roldán M, Serrano R and Vicente O (2002)

Expression of Arabidopsis SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants

The Plant Journal 30(5), 511±519

Frensch J & Hsiao TC (1994)

Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential.

Plant Physiology 25, 247–254.

Frensch J & Hsiao TC (1995)

Rapid response of the yield threshold and turgor regulation during adjustment of root growth to water stress in *Zea mays*.

Plant Physiology 25, 303–312.

Fu XD (1993)

Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins
Nature 365, 82 - 85

Fu, X.D. (1995).

The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors.
RNA, 1: 663-680.

Gall JG (2000)

CAJAL BODIES: The First 100 Years
Annual Review of Cell and Developmental Biology Vol. 16: 273-300

Gama-Carvalho M, Krauss RD, Chiang L, Valcárcel J, Green MR, Carmo-Fonseca M. (1997)

Targeting of U2AF⁶⁵ to sites of active splicing in the nucleus
J. Cell Biol. 137: 975– 87

Genty B, Briantais JM and Da Silva JBV (1987)

Effects of Drought on Primary Photosynthetic Processes of Cotton Leaves
Plant Physiology 83:360-364

Gil-Mascarell R, López-Coronado JM, Bellés JM, Serrano R and Rodríguez PL (1999)

The Arabidopsis HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase
The Plant Journal Volume 17 Page 373

Giles KL, Cohen D, and Beardsell MF (1976)

Effects of Water Stress on the Ultrastructure of Leaf Cells of Sorghum bicolor
Plant Physiol. 57, 11-14

Gläser H, Thomas D, Gaxiola R, Montrichard F, Surdin-Kerjan Y, and Serrano R (1993)

Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene.
EMBO J. August; 12(8): 3105–3110

Gorham, J. (1992).

Salt tolerance in plants.
Science Progress 76, 273-285

Graveley, BR. (2000).

Sorting out the complexity of SR protein functions.
RNA, 6: 1197-1211

Graveley, B.R., & Maniatis, T. (1998).

Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing.
Mol. Cell, 1: 765-771.

Graveley, B.R., Hertel, K.H. & Maniatis, T. (1999).

SR proteins are 'locators' of the RNA splicing machinery.
Curr. Biol., 9: R6-R7.

Greenway H and Munns R (1980)

Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes
Annual Review of Plant Physiology 31 149-190

Greenway H and Osmond CB (1972)

Salt Responses of Enzymes from Species Differing in Salt Tolerance
Plant Physiology 49:256-259

Guerrero FD, Jones JT, Mullet JE. (1990)

Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted: sequence and expression of three inducible genes.
*Plant Mol. Biol.*15:11–26

Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997)

SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling.
Electrophoresis 18: 2714-2723.

Gui,J.F., Lane,W.S. & Fu,X.D. (1994).

A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle.
Nature, 369: 678-682

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, and Davenport K (1998)

MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 1264-1300, Vol. 62, No. 4

Halfter U, Ishitani M, and Zhu JK (2000)

The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3
PNAS; 97;3735-3740;

Hampey M (1998)

Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery.
Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 465-503.

Hanson AD, Rathinasabapathi B, Rivoal J, Burnet M, Dillon MO and Gage DA (1994)

Osmoprotective Compounds in the Plumbaginaceae: A Natural Experiment in Metabolic Engineering of Stress Tolerance
PNAS Vol 91, 306-310,

Hartsock TL and Nobel S (1976)

Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake
Nature 262, 574 - 576 (12 August 1976)

Harvey DMR, Flowers TJ, Hall JL (1976)

Localization of Chloride in Leaf Cells of the Halophyte *Suaeda Maritima* by Silver Precipitation
New Phytologist, Vol. 77, No. 2, pp. 319-323

Heilmann I, Perera IY, Gross W, Boss WF. (1999)

Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*.

Plant Physiol. 119: 1331– 39

Heinrichs,V & Baker,B.S. (1997).

In vivo analysis of the functional domains of the Drosophila splicing regulator RBP1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 115-120.

Heiser,C.B. Jr (1990).

Seed to Civilization: The Story of Food.
Harvard University Press, Cambridge, MA

Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F and del Rio LA (1996)

Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants
Plant Science Vol. 105 Num.2 pp 151-167

Heslop-Harrison J (1979)

An Interpretation of the Hydrodynamics of Pollen
American Journal of Botany, Vol. 66, No. 6 pp. 737-743

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T (1999)

Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999.
Nucleic Acids Research Vol.27 No.1 pp. 297-300

Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, Shinozaki K. (1995)

A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3903– 7

Hoagland DR and Snyder WC (1933)

Proc. Am. Soc. Hort. Sci. **30**, 288.

Hoyos ME and Zhang S (2000)

Calcium-Independent Activation of Salicylic Acid-Induced Protein Kinase and a 40-Kilodalton Protein Kinase by Hyperosmotic Stress
Plant Physiol Vol. 122, pp. 1355-1364

Huang, Y., R. Gattoni, J. Stevenin, and J. A. Steitz. (2003).

SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export.
Mol. Cell **11**:837-843

Huang Y, Yario TA, and Steitz JA (2001)

A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export
PNAS vol. 101 no. 26 9666-9670

Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M (2002).

Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants.
Plant J. 29, 649–659.

Huntley B (1991)

How plants respond to climate change : migration rates, individualism and the consequences for plant communities
Annals of botany, vol. 67, pp. 15-22

Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, and Okada K (2001)

The DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis
The Plant Cell, Vol. 13, 2191–2209

Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W, and Zhu JK (2000)

SOS3 Function in Plant Salt Tolerance Requires N-Myristoylation and Calcium Binding
Plant Cell, Vol. 12, 1667-1678

Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., and Zhu, J.-K. (1997)

Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways.
Plant Cell 9, 1935–1949

Ishitani M, Nakamura T, Han SY, Takabe T. (1995)

Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid.
Plant Mol. Biol. 27:307–15.

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, et al. (2001)

Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis.
Plant J. 27: 325– 33

Jacobsen, T. & Adams, R.M. (1958).

Salt and silt in ancient mesopotamian agriculture.
Science, 128: 1251-1258.

Jefferson RA, Kavanagh TA, and Bevan MW (1987)

GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.
EMBO J. December 20; 6(13): 3901–3907

Johnson JM (1969)

A study of nucleolar vacuoles in cultured tobacco cells using autoradiography, actinomycin D, and electron microscopy
The Journal of Cell Biology, Vol 43, 197-206, 1969

Johnson, D.G. (2000).

The growth of demand will limit output growth for food over the next quarter century. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 5915-5920

Jordan EG (1984)

Nucleolar Nomenclature
J. Cell Sci. 67, 217-220

Jurica MS and Moore MJ (2003).

Pre-mRNA splicing. A wash in a sea of proteins.
Mol. Cell 12: 5-14.

Katsuhara M and Kawasaki T (1996)

Salt Stress Induced Nuclear and DNA Degradation in Meristematic Cells of Barley Roots
Plant and Cell Physiology, Vol. 37, No. 2 169-173

Kawakami,S, Padgett HS, Hosokawa D, Okada Y, Beachy RN and Watanabe Y (1999)

Phosphorylation and/or Presence of Serine 37 in the Movement Protein of Tomato Mosaic Tobamovirus Is Essential for Intracellular Localization and Stability In Vivo
Journal of Virology, August, p. 6831-6840, Vol. 73, No. 8

Kim F, Du L, Bregman DB, and Warren SL (1997)

Splicing Factors Associate with Hyperphosphorylated RNA Polymerase II in the Absence of Pre-mRNA
J. Cell Biol. Volume 136, Number 1, January 13, 19-28

Kiegerl S, Cardinale F, Siligan C, Gross A, Baudouin E, Liwosz A, Eklöf S, Till S, Bögre L, Hirt H, and Meskiene I (2000)

SIMKK, a Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Kinase, Is a Specific Activator of the Salt Stress-Induced MAPK, SIMK
Plant Cell, Vol. 12, 2247-2258, November

Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1993)

Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a CLPA, B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 196(3):1214–20.

Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1994)

Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes.
Plant Mol. Biol. 25:791–98

Knight H, Trewavas AJ, Knight MR

Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity
The Plant Journal 1997 12:1967-1978

Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, Shinozaki K. (1993)

Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*.
Gene 129:175–82

Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A.R. & Hagiwara, M. (1999).

The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs).
J. Biol. Chem., 274: 11125-11131.

Koornneef M, Léon-Kloosterziel KM, Schwartz SH, Zeevaart JAD (1998)

The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*.
Plant Physiol. Biochem. 36: 83– 89

Kovaleva L and Zakhlova K (2003)

Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L.

Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, and Harper JF

Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress
Plant Physiol, December 2002, Vol. 130, pp. 2129-2141

Ku,M.S.B., Agarie,S., Nomura,M., Fukayama,H., Tsuchida,H., Ono,K., Hirose,S., Toki,S., Miyao,M. & Matsuoka,M. (1999).

High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants.
Nature Biotechnol., 17:76–80

Kurepa J, Walker JM, Smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL, Sung D-Y, and Vierstra RD (2003)

The Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Protein Modification System in Arabidopsis: Accumulation of sumo1 and -2 conjugates is increased by stress
J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 9, 6862-6872, February 28,

Lai,M.Ch., Lin,R.I., Huang,S.Y., Tsai,Ch.W. & Tarn,W.Y. (2000).

A human importin- β family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins.
J. Biol. Chem., 275: 7950-7957

LaMorte VJ, Dyck JA, Ochs RL, and Evans RM (1998)

Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body
Vol. 95, Issue 9, 4991-4996, April 28, Cell Biology

Lamond AI, Earnshaw WC (1998)

Structure and function in the nucleus
Science. 280: 547– 53

Lawton KA, Potter SL, Uknes S and Ryals J (1994)

Acquired resistance signal transduction in Arabidopsis is ethylene independent.
Plant Cell 6, 581–588.

Lescot M, Dois P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzond P and Rombauts S (2002)

PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences
Nucleic Acids Res. Jan 1;30(1):325-327.

Lewis,L.N. (1984).

A vital resource in danger.
Calif. Agric., 38: 2.

Li J, Meyer AN, and Donoghue DJ (1997)

Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated
PNAS ;94;502-507

Lin S, Xiao R, Sun P, Xu X, Fu XD (2005)

Dephosphorylation-Dependent Sorting of SR Splicing Factors during mRNP Maturation
Molecular Cell, Vol 20, 413-425, 11

Liu Y, Zhang S, and Klessig DF (2000)

Molecular Cloning and Characterization of a Tobacco MAP Kinase Kinase That Interacts with SIPK

MPMI Vol. 13, No. 1, , pp. 118–124.

Liu J, Zhu JK. (1998)

A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance.

Science. Jun 19;280(5371):1906-7.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, et al. (1998)

Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature–responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis.

Plant Cell 10: 1391– 406

Liu J , Ishitani M, Halfter U, Kim CS, and Zhu JK (2000)

The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance

PNAS March 28, vol. 97 no. 7 3730-3734

Longman,D., Johnstone,I.L. and Cáceres,J.F. (2000)

Functional characterization of SR and SR related genes in *Caenorhabditis elegans*.

EMBO J., 19, 1625-1637

Longstreth DJ and Nobel PS (1979)

Salinity Effects on Leaf Anatomy: Consequences for Photosynthesis 1

Plant Physiology 63:700-703

Lopato,S., Mayeda,A., Krainer,A.R. & Bartha,A. (1996).

Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3074-3079.

Lu C and Zhang J (1999)

Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants

Journal of Experimental Botany, Vol 50, 1199-1206

Ma H (2005)

Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants

Annual Review of Plant Biology Vol. 56: 393-434

Maldonado E, and Reinberg D (1995)

News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II.

Current Opinion in Cell Biology 7: 352-61.

Manley,J.L. & Tacke,R. (1996).

SR proteins and splicing control.

Genes Dev., 10: 1569-1579.

Maquat LE, (2004).

Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **5**, pp. 89–99.

Martinez V and Läuchli A (1994)

Salt-induced inhibition of phosphate uptake in plants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)
New Phytologist Volume 126 Page 609 April

Matera AG, Ward DC. (1993)

Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells.
J. Cell Biol. **121**: 715–27

Matsui T, Omasa K and Horie T (1999)

Mechanism of Anther Dehiscence in Rice (*Oryza sativa* L.)
Annals of Botany **84**: 501-506,

Mermoud, J.E., Cohen, P.T.W. & Lamond, A.I. (1994).

Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism.
EMBO J., **13**: 5679-5688.

Meurs C, Basra AS, Karssen CM and van Loon LC (1992)

Role of Abscisic Acid in the Induction of Desiccation Tolerance in Developing Seeds of *Arabidopsis thaliana*
Plant Physiology **98**:1484-1493

Meyerowitz, E.M. (1989).

Arabidopsis, a useful weed.
Cell, **56**: 263-269.

Mikami K, Katagiri T, Luchi S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1998)

A gene encoding phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*.
Plant J. **15**: 563–68

Mikołajczyk M, Awotunde OS, Muszyńska G, Klessig DF, and Dobrowolska G (2000)

Osmotic Stress Induces Rapid Activation of a Salicylic Acid-Induced Protein Kinase and a Homolog of Protein Kinase ASK1 in Tobacco Cells
Plant Cell, Vol. **12**, 165-178, January

Millar RJ, Bell DT, and Koepp DE (1971)

The Effects of Water Stress on Some Membrana Characteristics of Corn Mitochondrial
Plant Physiol. **48**, 229-231

Mishra B, Priyadarsini KI, Kumar MS, Unnikrishnan MK and Mohan H (2003)

Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol
Bioorganic & Medicinal Chemistry Volume **11**, Issue **13** 3, Pages 2677-2685

Misteli, T., Cáceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F. & Spector, D.L. (1998).

Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo.

J. Cell Biol., 143: 297-307.

Mittler R, Zilinskas BA. (1994)

Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought.
Plant J. 5(3): 397–405

Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV and Aparicio-Tejo P (1994)

Drought induces oxidative stress in pea plants
Planta Issue Volume 194, Number 3 / August,

Mudgett MB, Clarke S. (1994)

Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair Lisoaspartyl methyltransferase in wheat.
J. Biol. Chem. 269(41):25605–12 1994.

Munnik T, Ligterink W, Meskiene I, Calderini O, Beyerly J, Musgrave A and Hirt H (1999)

Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress
The Plant Journal Volume 20 Page 381 - November

Munns, R. (2002)

Comparative physiology of salt and water stress.
Plant Cell Environ. 25, 239–250

Munns R & James RA (2003)

Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat
Plant and Soil 253: 201–218,

Murashige T, and F Skoog. (1962)

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiol Plant 15:473-497.

Murguia JR, Belles JM, Serrano R. (1995)

A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation.
Science. Jan 13;267(5195):232-4.

Murgía JR, Bellés JM and Serrano R (1996)

The Yeast *HAL2* Nucleotidase Is an *in Vivo* Target of Salt Toxicity
JBC Volume 271, Number 46, November 15. 29029-29033

Naidoo and Rughunanan (1990)

Salt Tolerance in the Succulent, Coastal Halophyte, *Sarcocornia natalensis*
J. Exp. Bot.; 41: 497-502

Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, et al. (2000)

Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression.
Plant Mol. Biol. 42: 657– 65

Naranjo MA, Forment J, Roldán M, Serrano R and Vicente O (2006)

Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants
Plant, Cell and Environment Volume 29 Page 1890 October

Neumann PM (1993)

Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl.
Plant, Cell and Environment 25, 1107–1114

Neugebauer KM (1995)

A conserved epitope on a subset of SR proteins defines a larger family of Pre-mRNA splicing factors
The Journal of Cell Biology Vol 129, 899-908

Nogués S and Baker NR (2000)

Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation
Journal of Experimental Botany, Vol. 51, No. 348, pp. 1309-1317, July

Nonami H, Boyer JS. (1990)

Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials.
Plant Physiol. 93:1610-19

Novatchkova M, Budhiraja R, Coupland G, Eisenhaber F and Bachmair A (2004)

SUMO conjugation in plants
Planta 220: 1–8 DOI 10.1007/s00425-004-1370

Niu X, Bressan RA, Hasegaw PM, and Pardo JM (1995)

Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments
Plant Physiol. 109: 735-742

Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD and Hanson AD (1999)

Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance
Current Opinion in Plant Biology, 2:128–134

Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W. and Nomura, M. (1993)

Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I.
Mol. Cell. Biol. 13, 2441–2455.

Olsson O (2001)

The Rise of Neolithic Agriculture
Working Papers in Economics, - handels.gu.se

Palancade B and Bensaude O (2003)

Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation
Eur. J. Biochem. 270, 3859-3870

Passioura JB and Munns R (2000)

Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate.

Australian Journal of Plant Physiology 25, 941–948.

Peitsch, MC (1995)

Protein modeling by E-mail

Bio/Technology 13: 658-660

Peleman J, Boerjan W, Engler G, Seurinck J, Botterman J, et al. (1989)

Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase.

Plant Cell 1:81–93

Perry, RP (1960)

On the nucleolar and nuclear dependence of cytoplasmic RNA synthesis in HeLa cells.

Exp. Cell Res., 20, 216–220.

Petersen-Mahrt, S.K., Estmer, C., Öhrmalm, Ch., Matthews, D.A., Russell, W.C. & Akusjärvi, G. (1999).

The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation.

EMBO J., 18: 1014-1024.

Prasad, J., Colwill, K., Pawson, T. & Manley, J.L. (1999).

The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing.

Mol. Cell. Biol., 19: 6991-7000.

Qin X, Zeevaart JAD (1999)

The 9-*cis*epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 15354– 61 1999

Quintero FJ, Garcideblas B, Rodriguez-Navarro A (1996)

The SAL1 gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast

Plant Cell. Mar;8(3):529-37.

Ramadan T (1998)

Ecophysiology of salt excretion in the xero-halophyte *Reaumuria hirtella*

New Phytologist Volume 139 Page 273

Raška I, Andrade LEC, Ochs RL, Chan EKL, Chang CM, et al. (1991)

Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies.

Exp. Cell Res. 195: 27– 37

Rausell A, Kanhonou R, Yenush L, Serrano R and Ros R (2003)

The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants

The Plant Journal 34, 257–267

Reddy AS (2004).

Plant serine/arginine-rich proteins and their role in pre-mRNA splicing.
Trends Plant Sci. **9**, 541–547

Redon R, Hussenet T, Bour G, Caulee K, Jost B, Muller D, Abecassis J and du Manoir S (2002)

Amplicon Mapping and Transcriptional Analysis Pinpoint *Cyclin L* as a Candidate Oncogene in Head and Neck Cancer
Cancer Research **62**, 6211-6217

Reed R (2003)

Coupling transcription, splicing and mRNA export
Current Opinion in Cell Biology **2003**, 15:326–331

Rios R, Ferrando A, Serrano R (1996)

Mechanisms of Salt Tolerance Conferred by Overexpression of the HAL1 Gene in *Saccharomyces cerevisiae*
YEAST Volume 13, Issue 6 , Pages 515 – 528

Rodríguez HG, Roberts JKM, Jordan WR & Drew MC (1997)

Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress.
Plant Physiology **25**, 881–893

Rombauts S, Dois P, Van Montagu M and Pierre Rouzond (1999)

Nucleic PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database
Acids Res. Jan 1;27(1):295-6.

Roth,M.B., Murphy,C. & Gall,J.G. (1990).

A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle.
J. Cell Biol., **111**: 2217-2223

Rudner,D.Z., Breger,K.S. & Rio,D.C. (1998).

Molecular genetic analysis of the heterodimeric splicing factor U2AF: the RS domain on either the large or small *Drosophila* subunit is dispensable in vivo.
Genes Dev., **12**: 1010-1021.

Sanford,J.R. & Bruzik,J.P. (2001).

Regulation of SR protein localization during development.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**: 10184-10189.

Sanford, J.R., Longman, D., and Cáceres, J.F. (2003).

Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation.
Prog. Mol. Subcell. Biol. **31**: 33-58

Sanford JR, Gray NK, Beckmann K and Cáceres JF (2004)

A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation
GENES & DEVELOPMENT **18**:755-768,

Savaldi-Goldstein,S., Sessa,G. & Fluhr,R. (2000).

The ethylene-inducible PK12 kinase mediates the phosphorylation of SR splicing factors.
Plant J., 21: 91-96.

Schubert S and Läubli A (1990)

Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars
Plant and Soil Volume 123, Number 2 April 205 - 209

Schul W, van Driel R, de Jong L (1998)

Coiled bodies and U2 snRNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required for snRNA transcription.

Mol. Biol. Cell 9: 1025– 36

Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003)

SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server.
Nucleic Acids Research 31: 3381-3385

Serrano R (1996)

Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses.
Int Rev Cytol.;165:1-52

Serrano R, Rodriguez-Navarro A (2001)

Ion homeostasis during salt stress in plants.
Curr Opin Cell Biol. Aug;13(4):399-404.

Sheen J (1996)

Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants
Science, 1996 - genetics.mgh.harvard.edu

Sheikh-Hamad D, Garcia-Perez A, Ferraris JD, Peters EM and Burg MB (1994)

Induction of gene expression by heat shock versus osmotic stress
Am J Physiol Renal Physiol 267: F28-F34,

Shen JR and Katoh S (1991)

Inactivation and Calcium-Dependent Reactivation of Oxygen Evolution in Photosystem II Preparations Treated at pH 3.0 or with High Concentrations of NaCl

Plant and Cell Physiology, Vol. 32, No. 3 439-446

Shen H, Kan JLC, and Green MR (2004)

Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Pre-spliceosome Assembly

Molecular Cell 16 567-576

Shen H and Green MR (2004)

A Pathway of Sequential Arginine-Serine-Rich Domain-Splicing Signal Interactions during Mammalian Spliceosome Assembly

Molecular Cell 16 363-373

Shi,H, Hoffman,B.E. & Lis, J.T. (1997).

A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the *Drosophila* SR protein B52.

Mol Cell. Biol., 17: 2649-2657.

Shi H, Ishitani M, Kim CS, and Zhu JK (2000)

The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter
PNAS vol. 97 no. 12 6896-6901

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (1997)

Gene expression and signal transduction in water-stress response.

Plant Physiol. 115: 327– 34

Sleeman JE, Lamond AI. (1999)

Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors.

Curr. Opin. Cell Biol. 11: 372– 77

Sidebottom,E. and Harris,H. (1969)

The role of the nucleolus in the transfer of RNA from nucleus to cytoplasm.

J. Cell Sci., 5, 351–364.

Simpson GG, Clark GP, Rothnie HM, Boelens W, van Venrooij W, and Brown JW (1995)

Molecular characterization of the spliceosomal proteins U1A and U2B" from higher plants.

EMBO J. September 15; 14(18): 4540–4550

Solomon-Blackburn,R.M. & Barker,H. (2001).

Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches.

Heredity, 86: 17-35

Soussi M, Ocaña A and Lluch C (1998)

Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.)

Journal of Experimental Botany, Vol. 49, No. 325, pp. 1329–1337, August

Spector, DL (1993).

Macromolecular domains within the cell nucleus.

Annu. Rev. Cell Biol. 9, 265-315.

Spector DL (1999)

Nuclear domains

Current Opinion in Cell Biology, 11:347–351

Stedle E (2000)

Water uptake by roots: effects of water deficit

Journal of Experimental Botany, Vol. 51, No. 350, pp. 1531-1542, September

Stewart GR and Lee JA (1974)

The role of proline accumulation in halophytes

Planta Volume 120, Number 3 January 279 - 289

Still DW, Kovach DA and Bradford KJ (1994)

Development of Desiccation Tolerance during Embryogenesis in Rice (*Oryza sativa*) and Wild Rice (*Zizania palustris*) (Dehydrin Expression, Abscisic Acid Content, and Sucrose Accumulation)

PLANT PHYSIOLOGY , Vol 104, Issue 2 431-438,

Suc JP (1984)

Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe
Nature 307, 429 - 432 (02 February)

Szabolcs. I. (1992).

Salinization of soil and water and its relation to desertification.
UNEP Desertification Control Bulletin **21**, 32-37

Takahashi S, Katagiri T, Hirayama T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2001)

Hyperosmotic stress induced a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture.
Plant Cell Physiol. 42: 214– 22

Tan KH, Tan TH (1998)

Principles of Soil Chemistry
1998 – books.google.com

Termaat A and Munns R

Use of Concentrated Macronutrient Solutions to Separate Osmotic from NaCl-specific Effects on Plant Growth
Australian Journal of Plant Physiology 13(4) 509 - 522

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000).

Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.
Nature, 408: 796-815.

Thomas D, and Tyers M (2000)

Transcriptional regulation: Kamikaze activators.
Current Biology 10: R341-R343.

Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, et al. (2000)

Ectopic expression of a tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes overproduction of abscisic acid.
Plant J. 23: 363– 74

Triezenberg SJ (1995)

Structure and function of transcriptional activation domains.
Current Opinion in Genetics and Development 5: 190-6.

Tronchere,H., Wang,J. & Fu,X.D. (1997).

A protein related to splicing factor U2AF35 that interacts with U2AF65 and SR proteins in splicing of pre-mRNA.
Nature, 388: 397-400.

Ungar IA (1987)

Population Characteristics, Growth, and Survival of the Halophyte *Salicornia Europaea*
Ecology, Vol. 68, No. 3 pp. 569-575

Valcarcel,J. & Green,M.R. (1996).

The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing.
Trends Biochem. Sci., 21: 296-301

Valentin,G. (1836)

Repertorium für Anatomie und Physiologie,
Verlag von Veit und Comp. 1, 1–293 Berlin

Verslues P.E, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J and Zhu JK (2006)

Methods and concepts in quantifying resistance salt and freezing, abiotic stresses that affect plant status
The Plant Journal 45, 523–539

Velasco R, Salamini F, Bartels D (1994)

Dehydration andABAincreasemRNAlevels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*.
Plant Mol. Biol. 26: 541–46

Vincent,WS (1955)

Structure and chemistry of nucleoli.
Intl. Rev. Cytol.,4, 269–298.

Wagner,R. (1835)

Einige Bemerkungen und Fragen über das eimbläschen (vesicula germinativa). *Müller's*
Archiv Anat. Physiol. Wissenschaft. Med., 373–377.

Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O and Bairlein F (2002)

Ecological responses to recent climate change
Nature 416, 389-395 28

Wang,J, Xiao,S.-H. & Manley,J.L. (1998).

Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing.
Genes Dev., 12: 2222-2233.

Wang,H.Y., Lin,W., Dyck,J.A., Yeakley,J.M., Sangyang,Z., Cantley,L.C. & Fu,X.D. (1998b).

SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells.
J. Cell. Biol., 140: 737-750.

Wang,X., Bruderer,S., Rafi,Z., Xue,J., Milburn,P.J., Krämer,A. & Robinson,P.J. (1999).

Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly.
EMBO J., 18: 4549-4559.

Weigel D., Ahn J.H., Blázquez M.A., Borevitz J.O., Christensen S.K., Fankhauser C., Ferrándiz C., Kardailsky I., Malancharuvil E.J., Neff M.M., Nguyen J.T., Sato S., Wang Z.Y., Xia Y., Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J., Yanofsky M.F., Chory J (2000)

Activation tagging in Arabidopsis,
Plant Physiol. 122 1003–1013.

Wilson C, Shannon MC (1995)

Salt-induced Na⁺/H⁺ antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato
Plant Science 107 147-157

Windgassen M, Sturm D, Cajigas IJ, González CI, Seedorf M, Bastians H, and Krebber H (2004)

Yeast Shuttleing SR Proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p Are Part of the Translating mRNPs, and Npl3p Can Function as a Translational Repressor
Molecular and Cellular Biology, p. 10479-10491, Vol. 24, No. 23

Will,C. & Lührmann,R. (1997).

Protein functions in pre-mRNA splicing.
Curr. Opin. Cell Biol., 9: 320-328.

Willandino L, Camara T, Boget N, Claparols I Santos M ; Torne JM (1996)

Polyamine and free amino acid variations in NaCL-treated embryogenic maize callus from sensitive and resistant cultivars
Journal of plant physiology, vol. 149, no1-2, pp. 179-185

Williams J, Bulman M, Huttly A, Phillips A, Neill S (1994)

Characterization of a cDNA from Arabidopsis thaliana encoding a potential thiol protease whose expression is induced independently by wilting and abscisic acid.
Plant Mol. Biol. 25:259-70 1994.

Wise MJ and Tunnacliffe A. (2004)

POPP the question: what do LEA proteins do?
Trends Plant Sci. Jan;9(1):13-7

Wu,J.Y. & Maniatis,T. (1993).

Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing.
Cell, 75: 1061-1070.

Wu WH, and Hampsey M (1999)

Common cofactors and cooperative recruitment.
Current Biology 9: R606-R609

Wyn Jones, R.G. and Pollard, A. (1983)

Encyclopedia of Plant Physiology (Laüchli, A. and Pirson, A., eds).
Berlin: Springer-Verlag, pp. 528-526.

Xiao,S.H. & Manley,J.L. (1997).

Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing.
Genes Dev., 11: 334-344.

Xiong L and Zhu J-K(2001)

Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives
Physiologia Plantarum Volume 112 Issue 2 Page 152

Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK (2001)

The Arabidopsis *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold and osmotic stress responsive gene expression.

Plant Cell. 13: 2063–83

Xiong, L., Ishitani, M., and Zhu, J.-K. (1999a).

Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in Arabidopsis.

Plant Physiol. 119, 205–211

Xue Y, Zhou F, Fu C, Xu Y, and Yao X (2006)

SUMOSP: a web server for sumoylation site prediction

Nucleic Acids Res. 34: W254 - W257

Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992)

Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein.

Plant Cell Physiol. 33(3):217–24.

Yan S, Tang Z, Su W and Sun W (2005)

Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root

Proteomics 5, 235–244

Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982)

Living with water stress: evolution of osmolyte system.

Science 217: 1214-1222

Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus, I. (2000)

Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm.

Science, 287: 303-305.

Yeo A, Lee K, Izzard P, Boursier PJ & Flowers TJ (1991)

Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.).

Journal of Experimental Botany 25, 881–889

Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressa RA, Hasegawa PM and Pardo JM (2002)

Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response

The Plant Journal Volume 30 Page 529

Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, et al. (1995)

Correlation between the induction of a gene for δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress.

Plant J. 7(5): 751–60

Yuryev A, Patturajan M, Litington Y, Joshi RV, Gentile C, Gebara M, and Corden JL (1996)

The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 9; 93(14): 6975–6980.

Zahler AM, Lane WS, Stolk JA and Roth MB (1992)

SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors
Genes & Development, Vol 6, 837-847

Zahler AM, Neugebauer KM, Lane WS, Roth MB (1993)

Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing.
Science. 9;260(5105):219-22.

Zahler, A.M., Neugebauer, K.M., Stolk, J.A. & Roth, M.B. (1993b).

Human SR proteins and isolation of a cDNA encoding SRp75.
Mol. Cell. Biol., 13 : 4023-4028.

Zhang Z and Krainer AR, (2004)

Involvement of SR Proteins in mRNA Surveillance
Molecular Cell 16 597-607

Zhu JK (2000)

Genetic Analysis of Plant Salt Tolerant Using Arabidopsis
Plant Physiology, Vol. 124, pp. 941–948

Zhu JK (2001)

Plant salt tolerance
TRENDS in Plant Science Vol.6 No.2

Zhu JK (2003)

Salt and drought stress signal transduction in plants
Annual Review of Plant Biology Vol. 53: 247

Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA. (1996)

Molecular aspects of osmotic stress in plants.
Crit. Rev. Plant Sci. 16: 253– 77

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W, (2004)

GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox.
Plant Physiol. 136: 2621-2632.