

UCH-FC
Biotecnología
T269
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Intercambio de promotores entre *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*,
una aproximación para determinar los factores que
regulan sus localizaciones en la membrana
plasmática**

Seminario de Título Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Ricardo Ignacio Tejos Ulloa

Enero de 2007

Santiago, Chile.

Directora de memoria de título: Lee A. Meisel, PhD



**“INTERCAMBIO DE PROMOTORES ENTRE PIN1, PIN2 Y PIN3,
UNA APROXIMACIÓN PARA DETERMINAR LOS FACTORES
QUE REGULAN SUS LOCALIZACIONES EN LA MEMBRANA
PLASMÁTICA”**

Seminario de Título Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

RICARDO IGNACIO TEJOS ULLOA

Dra. Lee Meisel
Directora de seminario de título

Firma manuscrita de Lee Meisel en tinta azul, sobre una línea horizontal.

Comision evaluadora de Seminario de Título

Dra. Claudia Stange
Presidente Comisión

Firma manuscrita de Claudia Stange en tinta azul, sobre una línea horizontal.

Dr. Michael Handford
Corrector

Firma manuscrita de Michael Handford en tinta azul, sobre una línea horizontal.

Dra Liliana Cardemil Oliva
Patrocinante

Firma manuscrita de Liliana Cardemil Oliva en tinta azul, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Enero de 2007

A mis padres y hermanos,
Mis fuentes de inspiración
y mi apoyo constante.

AUTOBIOGRAFÍA



Nací en Santiago el 20 de Enero de 1982, producto del amor de mis padres Mónica y Raúl. Me crié en tantas distintas casas entre Santiago y Curicó que ya perdí la cuenta. Este hecho me hizo vivir, por un lado, una relación muy estrecha con mis padres, mis tres hermanos, Felipe, Raúl y Marcelo, y Nicole, mi única hermana, siendo estos últimos de los pocos amigos de infancia que recuerdo. Por otro lado, creo que este hecho de alguna forma marcó aún más mi personalidad introvertida, sobre todo en la relación con el resto de las personas. En 1994, ingresé al Instituto Nacional, colegio en el cuál se forjó mi mentalidad crítica y científica. Eso es lo que creo ahora. Estando ahí decidí en 1997 estando en segundo medio (o tal vez antes) lo que quería estudiar: Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile (¿Que es eso?!). Ese mundo universitario que conocí en la Facultad de Ciencias me abrió los ojos a un mundo poco explorado para mí en ese entonces, aflorando en mí mi verdadera forma de ser. Hoy que termino esta nueva etapa, traté de buscar una foto que refleje mejor mi experiencia vivida. Y no me costó mucho. Esta foto que me tomaron camino al Parque Bosque Fray Jorge en Noviembre de 2006 representa bastante bien lo que siento ahora que termino mi carrera universitaria: Libertad y Felicidad. Porque más que enseñarme conocimientos, la vida en la universidad me enseñó otras cosas mucho más importantes que saber qué es un gen. Viví durante la universidad el periodo más fructífero de mis 25 años de vida, me quedo con muchos bonitos recuerdos, guardaré conmigo experiencias y lecciones de vida que ni me imaginé aprender, y, más importante aún, logré conocer a un grupo de gente en la que encontré muchos buenos amigos. Sin duda, si pudiera volver atrás y recomenzar todo lo haría tal cuál fue.

AGRADECIMIENTOS.

Hace siete años, una sencilla tarjeta en el bolsillo de mi padre bastó para cerrar un capítulo de mi vida, agradeciéndoles a Mónica y Raúl, mis padres, precisamente lo que soy como persona, y lo poco que había logrado hasta ese entonces. Hoy, que termina otra etapa más, es imposible que no se me vengan a mi mente ustedes dos de nuevo. Ambos son el espejo de la persona que quiero ser, de la familia que quiero formar, y son, por lo tanto, mi ejemplo de vida. Por eso esto para ustedes y por ustedes. Los amo.

No puedo dejar de lado a mis hermanos Felipe, Raúl, Marcelo y Nicole, que de una u otra forma siempre estuvieron y están a mi lado para apoyarme.

A Claudita, porque siempre estuviste ahí para acompañarme.

A mis amigos, el Negro, Nacho, Caroca, Felipe, Tuti, Fabiola, Nati, Pilar, el Cato con los que compartí innumerables noches de estudio y juerga. No lo olvidaré, seguro.

A mi tutora, Lee Meisel, que siempre me apoyó. Además agradezco mucho toda la libertad que me dio para desarrollar el trabajo de tesis.

A toda la gente del laboratorio, en especial a Andrea, Rodrigo y Daniela, que me dieron siempre sus sabios consejos y apoyo. Gracias.

A Rodrigo Caroca, Andrea Morales, Daniela Urbina, Cecilia Rodríguez Furlán y Herman Silva por sus valiosos comentarios del escrito de la tesis.

A la Iniciativa Científica Milenio que a través del Núcleo Milenio de Biología Celular de Plantas PCB P02-009-F financió mi tesis y mi bolsillo. Buena onda.

INDICE DE CONTENIDOS.

	pág
Informe de Aprobación.....	II
Autobiografía.....	IV
Agradecimientos.....	V
Índice de contenidos.....	VI
Índice de Tablas.....	IX
Índice de Figuras.....	X
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Abreviaciones.....	3
Introducción.....	4
Hipótesis, Objetivo General y Objetivos Especificos.....	12
Materiales y Métodos.....	13
1. Constructos de DNA.....	13
1.1 Purificación de ADN plasmidial.....	13
1.2 Análisis de restricción de ADN plasmidial.....	14
1.3 Construcciones Promotor PIN:GUS.....	14
1.3.1 Obtención de los promotores.....	14
1.3.2 Clonación de los promotores PIN en el vector binario pBI101.3.....	16
1.4 Intercambio de promotores.....	17
1.4.1 Obtención y clonación de genes PIN.....	17
1.4.2 Construcción de fusiones promotor:ORF.....	18
2. Trabajo con Bacterias.....	19
2.1 Células competentes de <i>Escherichia coli</i>	19

2.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	19
2.3 Células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.4 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3. Trabajo con Plantas	21
3.1 Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.2 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.3 Obtención de plantas mutantes y líneas transgénicas	23
3.4 Cruces dirigidos de los mutantes <i>pin</i>	24
4. Otros Ensayos.....	24
4.1 Ensayo de actividad GUS.....	24
4.2 Diseño de péptidos para la construcción de anticuerpos policlonales.....	25
4.3 Purificación de anticuerpos policlonales usando cromatografía de afinidad	26
4.4 Extracción de proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
4.5 Western blot.....	28
4.6 Inmunolocalización en planta completa.....	28
Resultados	30
• Los promotores de <i>Pin1</i> , <i>Pin2</i> y <i>Pin3</i> determinan dos regiones excluyentes de expresión en la raíz primaria	30
• Intercambio de promotores entre <i>Pin1</i> , <i>Pin2</i> y <i>Pin3</i>	34
• Cruces entre los mutantes <i>pin1-201</i> , <i>pin2-3</i> y <i>pin3-5</i> y las líneas transgénicas del intercambio de promotores	36

- La generación de cruces entre los mutantes *pin1-201*, *eir1-1* y *pin2-3* y la línea DR5rev:GFP permite evaluar la funcionalidad de los transportadores de auxina39
- Diseño y caracterización de anticuerpos policlonales contra las proteínas PIN1, PIN2 y PIN341
- Discusión45
- Conclusiones49
- Referencias50

INDICE DE TABLAS.

Tabla I. Clones y BACs usados en el presente trabajo.....	15
Tabla II. Mutantes en las proteínas PIN y otros usados en el presente trabajo.....	22
Tabla III. Análisis de segregación de la resistencia a kanamicina en las plantas transgénicas con los constructos promotor:GUS.....	32
Tabla IV. Análisis de segregación de la resistencia a higromicina en las plantas transgénicas con los constructos del intercambio de promotores.....	32
Tabla V. ANEXO I Listado de vectores construidos en la presente tesis.....	53
Tabla VI. ANEXO II Listado de partidores diseñados.....	56

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Las proteínas PIN de <i>Arabidopsis thaliana</i> tienen dos regiones hidrofóbicas conservadas, unidas por una región hidrofílica variable.....	6
Figura 2. La localización polar de PIN1, PIN2 y PIN3 en las células del ápice de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> define la dirección del transporte polar de auxina.....	8
Figura 3. Distintos modelos propuestos para explicar la destinación polarizada de las proteínas PIN	10
Figura 4. Generación de fusiones traduccionales entre el gen reportero GUS y los promotores de <i>Pin1</i> , <i>Pin2</i> y <i>Pin3</i>	31
Figura 5. Los promotores <i>Pin1</i> , <i>Pin2</i> y <i>Pin3</i> tienen distintos sitios de actividad en la raíz de <i>Arabidopsis</i>	33
Figura 6. Intercambio de promotores entre <i>Pin1</i> , <i>Pin2</i> y <i>Pin3</i>	34
Figura 7. Los marcadores moleculares para los constructos del <i>intercambio de promotores</i> permiten genotipar las planta transgénicas.....	35
Figura 8. El mutante <i>pin1-201</i> presenta fenotipos relacionados con la pérdida del transporte polar de auxina en el meristema floral y en el sistema vascular.....	37
Figura 9. El mutante <i>pin2-3</i> tiene una raíz agravitrópica	38
Figura 10. El marcador DR5rev:GFP permite evaluar la funcionalidad de los constructos del intercambio de promotores	40
Figura 11. La proteína PIN2 se localiza apicalmente en la corteza y epidermis de la raíz primaria	43
Figura 12. El anticuerpo antiPIN1 purificado por afinidad reconoce una señal en la epidermis y la vasculatura	44

RESUMEN.

En *Arabidopsis thaliana*, la localización en la membrana celular de la familia de proteínas PIN determina el transporte polar de auxina, generando y manteniendo gradientes fundamentales tanto para el desarrollo embrionario y post-embrionario como para las respuestas trópicas de las plantas. Se encontró en más de un caso la participación conjunta de distintos integrantes de la familia de proteínas PIN en determinar los flujos netos de la auxina en un tejido. Cada una de las proteínas PIN se acumula en distintos tipos celulares en un mismo tejido y, dentro de estas células, cada una se localiza en distintos lugares en la membrana plasmática. Este hecho nos sugiere la existencia de factores propios del tejido que determinan la localización polar conjunta de las proteínas PIN a distintos dominios en la membrana plasmática y, en definitiva, el transporte polar de auxina en un tejido. Para evaluar esta hipótesis, se realizó un intercambio de promotores entre tres componentes de la familia PIN de *A. thaliana* para expresar cada una de ellas en distintos tipos celulares, que normalmente no las acumulan. Se generaron las combinaciones entre los promotores y los ORF de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* y con ellas se generaron plantas transgénicas. Además con cada uno de los promotores se hicieron fusiones traduccionales con el gen reportero *uidA* para determinar en que tipos celulares son activos estos promotores. Además se sintetizaron anticuerpos policlonales contra PIN1, PIN2 y PIN3 y se analizó su especificidad. Con el anticuerpo antiPIN2 se detectó polarmente localizada a la proteína PIN2 en la epidermis, corteza y cap lateral en el ápice de la raíz.

ABSTRACT.

In *Arabidopsis thaliana* the cellular localization of the auxin efflux carriers, PINs, determines polar auxin transport, which in turn generates gradients fundamental for embryonic and post-embryonic development as well as plant tropic responses. It has been demonstrated that PIN proteins play an important role in determining polar auxin transport. Each member of the family of PIN proteins accumulates in different cell types and has a specific polar localization in the membrane of these cells. This suggests that there exists specific cellular factors that determine the location of PIN proteins and, subsequently, polar auxin transport. To evaluate this hypothesis, promoter swapping was realized between three members of the *A thaliana* PIN gene family, expressing each of them in cell types where they do not normally accumulate such that the localization of the ectopically expressed proteins may be analyzed. Constructs containing these combinations were generated between the promoters and the open reading frames of *Pin1*, *Pin2* and *Pin3* and were transformed into *Arabidopsis thaliana*. Additionally, each promoter was translationally fused with the reporter gene *uidA*, to determine in which cell types these promoters are active. Polyclonal antibodies against PIN1, PIN2 and PIN3 were synthesized and analyzed for their specificity. Additionally, Anti-PIN2 was used to detect the cellular localization of the PIN2 protein using whole mount immunolocalization.

ABREVIACIONES.

ABRC	Arabidopsis Bioresource Center
ADN	<u>A</u> cido <u>d</u> esoxiribon <u>n</u> ucleico
ARF-GEF	<u>A</u> DP <u>r</u> ibosylation <u>f</u> actor- <u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor
BAC	<u>B</u> acterial <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosome
BCA	<u>B</u> icinchoninic <u>a</u> cid
DIC	<u>D</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> ontrast
DPG	<u>D</u> ías <u>p</u> ost-germinación
GUS	β - <u>G</u> lucouronidase
gDNA	ADN genómico
IAA	<u>I</u> ndol <u>a</u> cetic <u>a</u> cid
<i>mdr</i>	<u>m</u> ultidrug <u>r</u> esistance <u>g</u> enes
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
pb	pares de <u>b</u> ases nucleotídicas
<i>stm1</i>	<u>S</u> terol <u>m</u> ethyl <u>t</u> ransferase 1
UTR	<u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion
wt	<u>w</u> ild <u>t</u> ype

INTRODUCCIÓN.

En la última década se ha acumulado extensa evidencia que relaciona estrechamente el transporte direccional de la hormona vegetal auxina a distintos procesos aparentemente sin conexión, como la generación y mantención del meristema apical de la raíz (Sabatini y col., 1999), la organogénesis (Benková y col., 2003) y la diferenciación del tejido vascular (Galweiler y col., 1998), así como la respuesta a estímulos trópicos como la luz y la gravedad (Blakeslee y col., 2004; Friml y col., 2002a). Sin embargo, a nivel celular todos estos procesos regulan la distribución de auxina por medio de una maquinaria de transporte común. La auxina ácido indol acético IAA se encuentra en el apoplasto en su forma protonada IAAH, en la que puede ingresar a la célula tanto por la acción de proteínas transportadoras (*los influx carriers*), como por simple difusión a través de la membrana. Una vez dentro de la célula, la auxina queda en su forma aniónica IAA⁻, que es incapaz de difundir libremente por la membrana celular, pudiendo ser transportada fuera de la célula sólo por la acción de otro tipo de proteínas transportadoras de membrana, los *efflux carriers* PIN. Se ha demostrado que la acción conjunta de ambos tipos de transportadores en los tejidos y tipos celulares donde co-expresan pueden regular etapas críticas en la respuesta del tejido en la formación de nuevos órganos como hojas, flores y raíces laterales (Benková y col., 2003; Reinhardt y col., 2003), así como en la respuesta gravitrópica de la raíz (Friml y col., 2002a). Sin embargo, son los *efflux carriers* los que parecen ocupar un rol fundamental en mantener los flujos de auxina presentes en un tejido y redireccionarlos en respuesta a estímulos externos (Friml y col., 2002a) y en el

desarrollo embrionario (Friml y col., 2003a) y post-embrionario (Benková y col., 2003; Reinhardt y col., 2003)

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* hay ocho loci correspondientes a la familia de los *efflux carriers* PIN, cinco de los cuales tienen alguna función conocida (*Pin1*, -2, -3, -4, -7. Galweiler y col., 1998; Müller y col., 1998; Friml y col., 2002a; Friml y col., 2002b). Interesantemente, estos loci "funcionales" pertenecen a una subfamilia de genes, debido a que poseen una estructura de exones e intrones similar, que se encuentra bien representada en mono- y dicotiledóneas (Papanov y col., 2005). Además estos loci codifican para proteínas que tienen una topología similar. Las proteínas PIN1, -2, -3, -4 y -7 comparten una alta homología en las dos grandes regiones hidrofóbicas que se encuentran en el amino- y en el carboxilo-terminal, de entre 4 y 5 segmentos de transmembrana cada uno (Figura 1). Estos dos dominios, donde posiblemente reside la actividad transportadora, están unidos por un bucle hidrofílico, probablemente citosólico, altamente variable entre las proteínas (Figura 1). En estas regiones no existen dominios funcionales conocidos. Por otro lado, las proteínas PIN5, PIN6 y PIN8 perdieron alguno(s) de estos dominios.

La localización polarizada de los componentes de la familia PIN en la membrana plasmática coincide con la dirección del flujo de auxina *in vivo*, lo que nos hace pensar que estas proteínas son efectivamente las transportadoras de auxina o que, por lo menos, están estrechamente relacionadas con él, tal vez a través de la formación de complejos proteicos (Lusching, 2001). Por ejemplo, en la raíz primaria se determinó que PIN1 está basalmente localizado en las células de la vasculatura del eje de la inflorescencia y de la raíz y en las dos capas adyacentes a la vasculatura en la raíz, periciclo y endodermis (Galweiler y col., 1998; Friml y col., 2001b). PIN2 está localizado apicalmente en el cap lateral, la epidermis y la corteza,

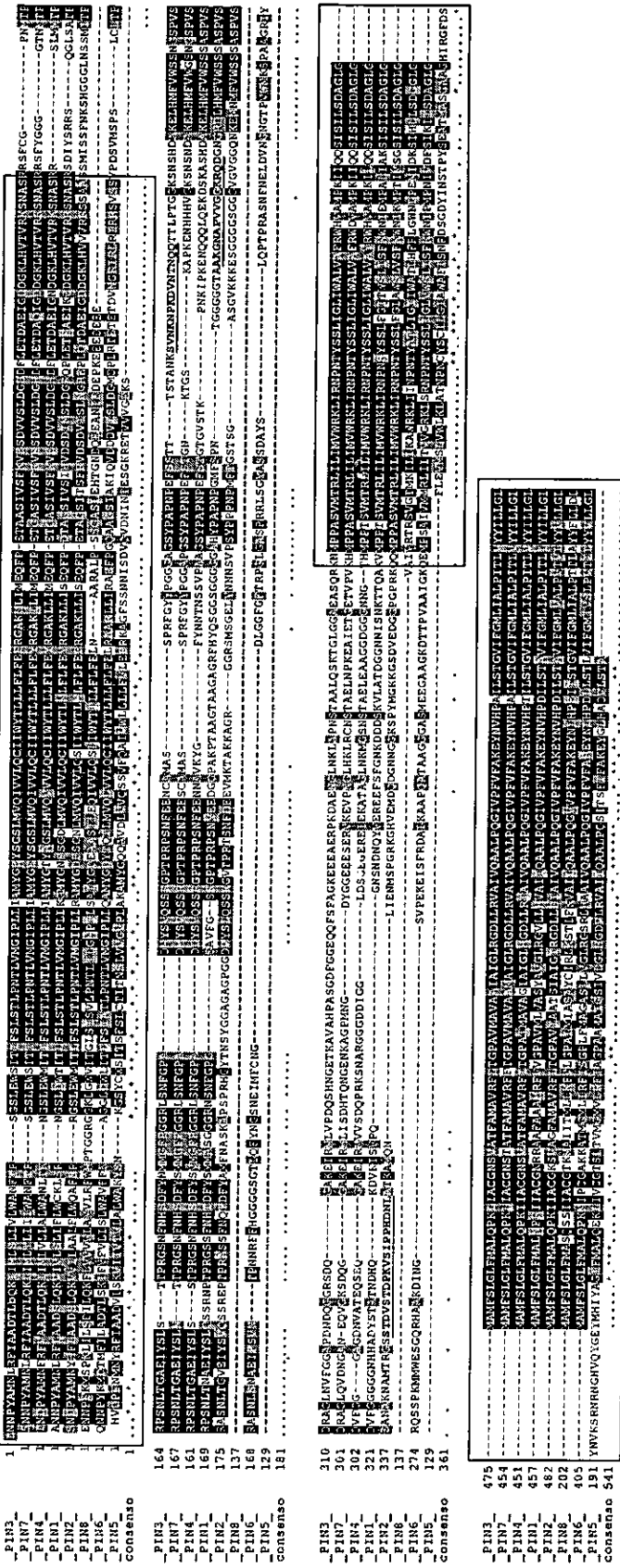


Figura 1. Las proteínas PIN de *Arabidopsis thaliana* tienen dos regiones hidrofóbicas conservadas, unidas por una región hidrofílica variable. Cinco de los ocho componentes de la familia de los efflux carriers de *Arabidopsis thaliana* tienen alguna función conocida (PIN1, 2, 3, 4, 7), mientras que para los otros tres no se han descrito mutantes ni caracterizado funciones. Estos cinco componentes "funcionales" muestran una alta homología en las regiones amino- y carboxilo-terminal (cajas), las cuales presentan mayoritariamente aminoácidos hidrofóbicos y son posiblemente regiones de transmembrana. Estas dos regiones se encuentran conservadas a través de las proteínas PIN del reino vegetal. Entre estos dos grandes dominios hidrofóbicos se encuentra una región hidrofílica altamente variable entre los componentes de la familia, parcialmente ausente en PIN5 y PIN8, en la que no existen dominios funcionales conocidos. Sobre esta zona se escogieron péptidos (subrayados) para hacer anticuerpos policlonales. El alineamiento se realizó con el algoritmo ClustalW en la página web <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> y la visualización del alineamiento con http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html.

donde además se localiza en la cara lateral adyacente a la epidermis (Müller y col., 1998, Figura 2). PIN3 está expresado en los tejidos que sensan los estímulos gravitrópicos. En hipocotilo y tallo se localiza en la superficie lateral de la célula (Figura 2). En la columella de la raíz, PIN3 está simétricamente distribuido. Sin embargo, en respuesta a estímulos gravitrópicos esta proteína se relocaliza lateralmente en un mecanismo que depende de actina (Friml y col., 2001a). PIN4 se expresa en las células del centro quiescente de la raíz y en las proximidades del meristema, sin polaridad pronunciada (Friml y col., 2001b). PIN7 reside en las membranas basal y lateral de las células iniciales de la vasculatura en el meristema y la zona de elongación, mientras que coincide en los dominios con PIN3 en la columella de la raíz (Blilou y col., 2005) (Figura 2).

La expresión de los genes PIN en la raíz primaria se da en dominios específicos que pueden solaparse, aunque cada una de las proteínas PIN se localiza en la membrana celular de una manera polarizada particular. Ambas características las hacen un buen modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en determinar la polaridad celular. ¿Cuáles son los factores o señales que determinan la destinación polarizada de las proteínas PIN a la membrana celular? ¿Estos mecanismos son célula-específicos o están determinados en la secuencia o estructura proteica de los PIN?

Factores intracelulares involucrados en la destinación de las proteínas PIN a la membrana plasmática.

No obstante la extensa evidencia que liga a las proteínas de la familia PIN con el transporte de auxina (Friml 2003c), los factores que regulan su destinación polarizada

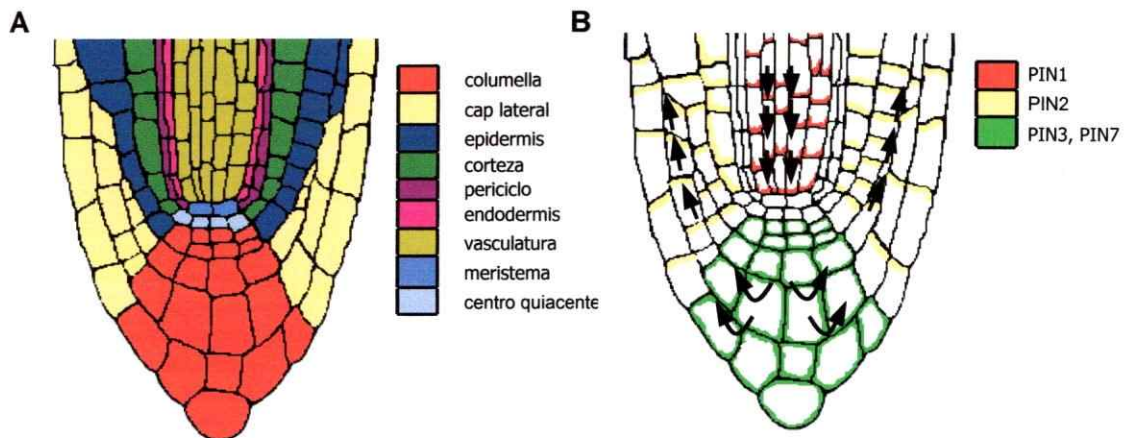


Figura 2 La localización polar de PIN1, PIN2 y PIN3 en las células del ápice de la raíz de *Arabidopsis thaliana* define la dirección del transporte polar de auxina. **A.** Dibujo esquemático de los tipos celulares que forman parte del ápice de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. Existe en el centro un grupo de células meristemáticas que dan origen al resto de los tejidos, salvo a las células de la columella que se originan del centro quiescente. **B.** El transporte de auxina en el ápice de la raíz es acropétalo (hacia el meristema o ápice) en la vasculatura, y basipétalo (alejándose del meristema) en la corteza y la epidermis. El flujo neto de auxina (→) puede ser explicado por la localización polar de los putativos *efflux carriers* PIN. En la vasculatura, PIN1 se localiza basalmente en la membrana celular transportando la auxina acropetalamente hacia la zona meristemática y de la columella, donde PIN4 (no mostrado) y PIN3 y PIN7, principalmente, la redistribuyen hacia el cap lateral. El transporte basipétalo por la corteza y el cap lateral se explica por la acción de PIN2, que en estos tipos celulares se localiza apicalmente. Adaptado de Friml 2003c.

a la membrana plasmática en los distintos tipos celulares que las expresan no están del todo claros. Evidencias previas involucraron a los flavonoides endógenos como reguladores naturales del transporte polar de auxina (Peer y col., 2004). Estos autores demostraron que la localización polar de alguno de los componentes de la familia PIN cambia en mutantes deficientes en la biosíntesis de flavonoides. Se conoce en modelos animales que los flavonoides afectan la actividad de quinasas por lo que se piensa que los flavonoides estarían influyendo en la fosforilación de proteínas o lípidos. Esta hipótesis se ve apoyada por la deslocalización de PIN1 mostrada en el mutante *pid* de *Arabidopsis*, que tiene un defecto en una putativa Ser/Tre quinasa (Christensen y col., 2000). La sobreexpresión de PID cambia la localización polar de PIN1 de basal a apical, mientras que mutantes de pérdida de función muestran un cambio de apical a

basal (Friml y col., 2004). Los blancos moleculares de PID no están claros, aunque recientes evidencias lo vinculan con la proteína quinasa dependiente de fosfolípidos PDK1 (Zegzouti y col., 2006), quien actuaría como activador de PID en respuesta a estímulos percibidos en la membrana plasmática. Por otro lado, se ha mostrado que las proteínas PIN reciclan constitutivamente desde la membrana celular hasta compartimentos endosomales, en un proceso regulado por el ARF-GEF GNOM y el citoesqueleto de actina (Steinmann y col., 1999, Geldner y col., 2003). Este reciclaje constitutivo no tiene relación con una síntesis *de novo* de la proteína, sino que permite una rápida respuesta de la célula frente a cambios en estímulos externos como la luz y gravedad (Friml y col., 2002a, Blakeslee y col., 2004).

La identidad lipídica de la membrana parece jugar un papel importante en determinar la polaridad celular. El mutante STEROL METHYLTRANSFERASE 1 (*stm1*) fue primero identificado por defectos en el patrón de la raíz, pero la posterior clonación del gen reveló que codifica una enzima involucrada en la síntesis y composición de esteroides de membrana. *stm1* muestra defectos generales en la localización polarizada de organelos como el núcleo y los amiloplastos en la célula, así como la deslocalización de las proteínas PIN1 y PIN3 en la membrana plasmática (Willemsen y col., 2003). Esto, junto a evidencias que vinculan el tráfico de proteína PIN2 con el de esteroides de membrana en endosomas tempranos ARA6-positivos (Grebe y col., 2003), dan luces para la existencia en *Arabidopsis* de dominios de lípidos de membrana tipo RAFTs, que juegan un rol importante en determinar sitios específicos de destinación de proteínas a la membrana celular en animales (Brown 2000), pero aún no se demuestra su existencia en plantas. La posterior caracterización de proteínas de la familia tipo *multidrug resistance genes* (*mdr*) en *Arabidopsis* reveló su participación directa tanto

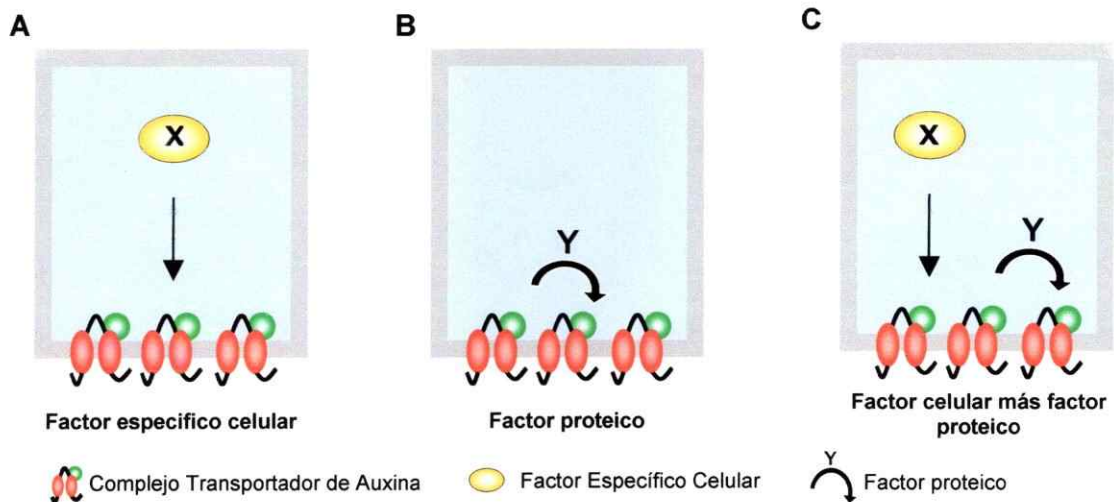


Figura 3. Distintos modelos propuestos para explicar la destinación polarizada de las proteínas PIN. Ante la pregunta de qué determina la destinación polarizada de las proteínas PIN en los distintos tipos celulares que los expresan en un tejido en particular (por ejemplo, el ápice de la raíz), nos planteamos tres distintas alternativas. **A.** La primera alternativa es que existe un factor propio del tipo celular (Factor X) que determina donde se localizará la proteína PIN, sin importar cual de ellas sea. **B.** La segunda alternativa es que existe dentro de la secuencia o estructura de la proteína PIN una señal (señal Y) que es capaz de determinar por si sola la localización polar de cada una de las proteínas PIN. **C.** La tercera alternativa es una suma de las dos primeras, es decir, tanto factores propios del tipo celular como señales en la estructura o secuencia de la proteína determinan en conjunto la destinación polarizada de las proteínas PIN.

en el *efflux* de auxina como en la estabilización del complejo transportador (caracterizado por las proteínas PIN) en la membrana plasmática en dominios de membrana tipo-RAFTs (Geisler y col., 2005).

Entonces la localización polar de las proteínas PIN depende de múltiples factores de naturaleza proteica como lipídica que pueden determinar en conjunto la destinación polarizada de estas proteínas a la membrana plasmática. ¿Qué determina la localización polarizada de las proteínas PIN en los distintos tipos celulares que los expresan? Para explicar esta pregunta nos planteamos tres distintos modelos (Figura 3). El primero es que existen factores de naturaleza proteica o lipídica propios de cada

tipo celular que determinan donde se destinará cada una de las proteínas PIN, sin importar cuál sea ésta (Figura 3A). La otra alternativa es que existen señales dentro de la secuencia o estructura proteica de las proteínas PIN que son suficientes para determinar la destinación polar de cada una de ellas, sin importar de qué tipo celular se trate (Figura 3B). La tercera alternativa considera la existencia tanto de factores propios del tipo celular como señales presentes en las proteínas que determinan en conjunto la destinación polar de las proteínas PIN a la membrana plasmática (Figura 3C).

Con el fin de mostrar que existe un mecanismo célula-específico que determina la destinación polarizada de los componentes de la familia PIN, se realizará un intercambio de promotores entre tres proteínas de la familia PIN, lo que permitirá expresar *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* en dominios donde normalmente no se expresan (realizar una *expresión ectópica*) y evaluar su nueva localización en la membrana plasmática.

HIPÓTESIS.

"Factores intrínsecos celulares pueden estar involucrados en determinar la localización polar de los transportadores de auxina PIN"

OBJETIVO GENERAL.

Desarrollo de herramientas moleculares para analizar si factores intrínsecos celulares determinarían la localización subcelular de los PIN

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar los sitios de funcionalidad de los promotores de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* en *Arabidopsis thaliana*.
2. Intercambio entre los promotores y los marcos de lectura abierto de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* in planta.
3. Desarrollo de cruces entre el marcador de los gradientes de auxina DR5rev:GFP y los mutantes *pin* para comprobar la funcionalidad de las proteínas PIN expresadas ectópicamente por el intercambio de promotores.
4. Diseño y caracterización de anticuerpos policlonales contra las proteínas PIN1, PIN2 y PIN3.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Constructos de DNA

1.1 Purificación de ADN plasmidial.

Usualmente, la búsqueda de colonias positivas para los clones se hizo mediante la digestión de ADN plasmidial extraído de cultivos de noche de bacterias usando el método de lisis alcalina (Zhou y *col.*, 1990). Brevemente, 1mL de cultivo de noche se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 300 μ L de tampón TENS (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaOH 0,1 M, SDS 0,5 %) se agitó en vórtex y se le agregó 150 μ L de Acetato de Potasio 3 M pH 4,7. Se vuelve a agitar con vórtex, y se centrifugó por dos minutos a 14000 rpm. Luego al sobrenadante se le agregaron 800 μ L de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó 2 min a 14000 rpm. El precipitado se lavó una vez con etanol 80% frío, se secó y resuspendió en 20-40 μ L de agua nanopura estéril con 10 μ g/ μ L de RNAsa A (Fermentas). El ADN obtenido es apto para su utilización en reacciones de PCR y de digestión con enzimas de restricción. Este mismo protocolo se adaptó en el laboratorio para hacer minipreps de *Agrobacterium tumefaciens*. El precipitado de 2 mL de un cultivo de noche se resuspendió en 100 μ L de una solución glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8,0, se agitó usando vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego se agregaron 20 μ L de lisozima 20 mg/mL, se agitó por unos segundos y se incubó a 37°C por 15 min. Luego se agregó 200 μ L de una solución fresca de NaOH 0,2 M, SDS 1%, se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Luego se procedió como en la miniprep de *E. coli* desde el paso de agregado de Acetato de Potasio. Con el ADN extraído se realizaron reacciones de PCR o se transformaron bacterias de *E. coli* para propagar el vector.

1.2 Análisis de restricción de ADN plasmidial.

La verificación de las colonias positivas para todos los clones se hizo mediante el patrón de digestión con enzimas de restricción hecho sobre ADN plasmidial extraído con el método de lisis alcalina (descrito en Materiales y Métodos 1.1). Estas reacciones de digestión de ADN con enzimas de restricción se hicieron típicamente a 37°C, por 1-3 h, usando 2 µL de ADN plasmidial, tampón de reacción 10X y 0,3 µL de la enzima en un volumen total de 20 µL. Cuando fue necesario hacer dobles digestiones la enzima de restricción se inactivó por calor y se purificó el ADN luego de la primera digestión precipitándolo con etanol. A un volumen de reacción se le agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) y 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M pH 5,2, se mezcló por inversión, y se precipitó a -20°C por 1 h. Luego se centrifugó 15 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se lavó tres veces con etanol 80% frío. Después se secó el ADN a temperatura ambiente o a 37°C y se resuspendió en el volumen deseado de agua para realizar la segunda digestión.

1.3 Construcciones Promotor-PIN:GUS.

1.3.1 Obtención de los promotores.

Las secuencias promotoras se definieron usando la herramienta informática *Mapviewer* disponible en el sitio web <http://www.arabidopsis.org/>. Con esta herramienta se puede visualizar una secuencia codificante en el contexto de su cromosoma, lo que permite ver además las secuencias de los putativos genes vecinos. Así un promotor se definió como la región intergénica, río arriba del codón de inicio de la traducción ATG, de un largo variable no inferior a los 1000 pb. El promotor de PIN1 es de 1932 pb, el de PIN3 es de 1764 pb y el de PIN4 es de 1764 pb. En el caso del promotor de PIN2, la

Tabla I. Clones y BACs usados en el presente trabajo. Estos clones fueron obtenidos de stocks internacionales *Arabidopsis* Bioresource Center (ABRC, #) y de RIKEN (*).

Nombre	Tipo	Vector	Características
U12338 #	clon PIN1 ORF	pUni51	ORF de PIN1 en un vector de recombinación universal. No incluye UTR.
U21751 *	clon PIN2 ORF	pUni51	ORF de PIN1 en un vector de recombinación universal. No incluye UTR.
RAFL07-12-J09 †	clon PIN3 ORF	AZAP	Clon de una genoteca construida a partir de plántula completa de tres a cuatro semanas. Secuencia incluye UTRs.
F6D5 #	PIN1 BAC	PBELOBAC-KAN	Genoteca de <i>Arabidopsis thaliana</i> construida con DNA genómico de callos de raíz y clonados en un cromosoma artificial bacteriano.
MUL3 #	PIN2 BAC	pAD10SACBII	Genoteca de DNA genómico extraído de núcleos de <i>Arabidopsis thaliana</i> y clonados en un cromosoma artificial de bacteria.
F15H11 #	PIN3 BAC	PBELOBAC-KAN	Genoteca de <i>Arabidopsis thaliana</i> construida con DNA genómico de callos de raíz y clonados en un cromosoma artificial bacteriano.

secuencia es toda la región intergénica, lo que corresponde a un fragmento de 1399 pb.

Los promotores de PIN1 (pPIN1), PIN2 (pPIN2), PIN3 (pPIN3) y PIN4 (pPIN4) fueron amplificados por PCR desde DNA extraído de cromosomas artificiales de bacterias (BACs, Tabla I), usando los partidores específicos NM9 y NM10 (detalles de todos los partidores en Tabla VI) para pPIN1 (1932 pb), NM11 y NM12 para pPIN2 (1399 pb), NM21 y NM22 para pPIN3 (1764 pb) y los partidores NM25 y NM26 para pPIN4 (1764 pb). Las reacciones de PCR fueron estandarizadas usando Taq polimerasa, obteniéndose el siguiente protocolo óptimo: 94 °C 4 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 2 min, y finalmente 72 °C por 10 min). Luego se hizo la reacción con las enzimas con actividad correctora *Pfu* DNA polimerasa (Fermentas) o AccuTherm® DNA polimerasa (GeneCraft), usando las condiciones estandarizadas para amplificar con Taq, pero con el doble de tiempo de elongación debido a que este tipo de enzimas tienen una procesividad menor. Los amplificados de PCR obtenidos con enzimas con actividad correctora, *Pfu* o AccuTherm, dan como producto fragmentos

de extremos romos. La posterior adición de una adenina en sus extremos (adenilación) permite el clonamiento en vectores T como pGEM-T o pBlueScript-T. Para la adenilación se mezclaron en un tubo de PCR tampón Taq polimerasa (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, pH 8,3), Taq polimerasa, 0,5 mM desoxiadenina, y 200 ng de inserto romo. La mezcla se incubó a 72°C por 30 min. Luego de esto, el inserto queda apto para realizar la ligación con pGEM-T o pBlueScript-T.

Las cantidades de vector para hacer la ligación estuvieron en el rango de 20-50 ng en la reacción de ligación, y de inserto idealmente sobre 40 ng para un volumen final de reacción de 10 µL. Una reacción típica de ligación contenía entre 20 y 50 ng de vector, 30-40 ng de inserto, 10 mM ATP fresco, tampón de ligación (Tris-HCl 30 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 10 mM, pH 7,8), y 0,25 unidades Weiss/µL de ligasa T4 (Fermentas), y se incubó toda la noche a 16°C. Los productos de PCR adenilados fueron clonados y secuenciados en los vectores pGEM-T (pPIN1, pPIN3, pPIN4) o en pBluescript-T (pPIN2), comprobándose la ausencia de mutaciones puntuales en sus secuencias.

1.3.2 Clonación de los promotores PIN en el vector binario pBI101.3.

En los partidores para amplificar los promotores se introdujo sitios de corte de enzimas de restricción que permiten hacer la fusión con el gen reportero GUS (y además con los ORFs de los transportadores, como se verá en el punto 1.2 de Materiales y Métodos). En los partidores NM9, NM11 y NM22 se introdujo el sitio de corte para Sall, que queda flanqueando el promotor en el extremo 5'. En los partidores NM10, NM12 y NM21 se introdujeron los sitios de corte para NcoI y PstI, ambos sitios en el 3' del promotor, separados por dos pares de bases que permiten dejar en marco el ATG del sitio NcoI con el ATG del ORF (ver Tabla VI, Materiales y Métodos 1.2). Los clones de

los promotores en pGEM-T o pBlueScript-T se cortaron con las enzimas Sall y NcoI, y se movilizaron al vector pSL3 (5980 pb, Amp^R, GUS:E9) digerido con las mismas enzimas, generándose así las fusiones pPIN1:GUS:E9, pPIN2:GUS:E9 y pPIN3:GUS:E9 (vectores pSL3.pPIN1, pSL3.pPIN2, pSL3.pPIN3, respectivamente). En este vector las fusiones quedan flanqueadas por las enzimas Sall en el extremo 5' del promotor, y EcoRI en el extremo 3' del terminador E9 (terminador de la subunidad mayor de la Rubisco). La digestión con estas enzimas libera la fusión pPINX:GUS:E9 que fue posteriormente movilizadora al vector binario pBI101.3 entre los sitios Sall y EcoRI, dentro de los extremos derecho e izquierdo de la secuencia de T-DNA (ver Figura 4C).

1.4 Intercambio de promotores.

1.4.1 Obtención y clonación de genes PIN.

El intercambio de promotores se realizó usando las secuencias promotoras y codificantes de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*. Las secuencias promotoras son las mismas descritas en 1.1 de Materiales y Métodos. Los ORFs de PIN1 (oPIN1), PIN2 (oPIN2) y PIN3 (oPIN3) fueron amplificados por PCR a partir de clones de ORFs completos disponibles en los bancos de Arabidopsis Bioresource Center (ABRC) o RIKEN BRC (Tabla I). La reacción de PCR se estandarizó usando la enzima Taq polimerasa, para luego hacer la amplificación con *Pfu* DNA polimerasa (Fermentas) usando el siguiente protocolo: 94 °C 4 min, 30 ciclos de 94 °C 30 s, 55 °C 30 s y 72 °C 4 min, y finalmente 72 °C por 10 min. La amplificación se realizó con los partidores NM14 y NM15 para oPIN1 (1869 pb), NM18 y NM19 para oPIN2 (1944 pb) y los partidores NM23 y NM24 para oPIN3 (1923 pb) (Tabla VI). Los amplificados se adenilaron y clonaron en el vector pGEM-T, donde se secuenciaron y se comprobó la ausencia de mutaciones.

1.4.2 Construcción fusiones promotor:ORF.

Tal como se hizo con los promotores, en los extremos de los ORFs se insertaron sitios de corte para enzimas de restricción. En los partidores NM14, NM18, NM23 se insertaron los sitios para PstI, y en los partidores NM15, NM19 y NM 24 se insertaron los sitios de corte para BamHI (Tabla VI). El clon pGEM-T.oPIN1 se cortó con las enzimas Sall (en el sitio de múltiple clonamiento del vector) y PstI (insertada en el partidor NM14) y en ese vector se clonaron los promotores pPIN1 y pPIN3 cortados con las mismas enzimas, generándose las fusiones pPIN1:oPIN1 y pPIN3:oPIN1, flanqueadas por los sitios Sall y BamHI, en los extremos 5' y 3', respectivamente.

Los vectores pGEM-T.pPIN1:oPIN1 y pGEM-T.pPIN3:oPIN1 se cortaron con las enzimas BamHI y PstI que flanquean el oPIN1. En esa digestión se purificaron los vectores pGEM-T.pPIN1 y pGEM-T.pPIN3 cortados con las enzimas BamHI y PstI a los que se ligó el oPIN2 digerido con las mismas enzimas, generándose así las fusiones pPIN1:oPIN2 y pPIN3:pPIN2 en pGEM-T. Estas cuatro fusiones (pGEM-T.1:1, pGEM-T.1:2, pGEM-T. 3:1, pGEM-T.3:2) se cortan con las enzimas BamHI y Sall, purificándose las fusiones flanqueadas por los cortes Sall y BamHI, que posteriormente se movilizaron al vector binario pCAMBIA.GUS.E9 (14000 pb, Hyg^R, GUS:E9 proveniente de pSL3 entre los sitios Sall y EcoRI de pCAMBIA1300, dentro del T-DNA) río arriba del terminador E9. Así se generaron los constructos pCAMBIA.1:1, pCAMBIA.1:2, pCAMBIA.3:1 y pCAMBIA.3:2.

El resto de las combinaciones se realizó mediante una triple ligación del promotor, como fragmento Sall/PstI, el ORF-flanqueado por sitios PstI y BamHI y el vector pCAMBIA.GUS:E9 digerido con las enzimas Sall y BamHI y purificado desde gel. Se usaron entre 30-50 ng de insertos y 20-30 ng de vector más ATP 10 mM, tampón de ligación (Tris-HCl 30 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 10 mM, pH 7.8), y 0,25

unidades Weiss/ μ L de ligasa (Fermentas). Esta mezcla se incubó durante toda la noche a 16°C. Las fusiones obtenidas quedaron en vectores binarios, listos para transformar *Agrobacterium tumefaciens* y *Arabidopsis thaliana*, y con el mismo terminador usado para los constructos promotor: GUS descritos en Materiales y Métodos 1.3.2 (Figura 4).

2 Trabajo con bacterias.

2.1 Células competentes de *Escherichia coli*.

Las células competentes fueron preparadas usando el método descrito por Inoue y *col.*, 1990, con ciertas modificaciones. Se inocularon 250 mL de medio SOC (triptona 2 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, NaCl 1 mM, KCl 0,25 mM, MgCl₂/MgSO₄ 2 mM, glucosa 2mM) con 0,5 mL de un cultivo de noche de células DH5 α y se crece 25°C hasta que alcanzó una DO₆₀₀ = 0,6. Las células se enfriaron en hielo por 10 min y luego se centrifugaron a 2500 g por 10 min a 4°C. Se resuspendió el precipitado en 80 mL de tampón TB (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM, pH 6,7) frío y se incubó en hielo por 10 min. Luego se centrifugó a 2500 g por 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 20 mL de tampón frío TB/DMSO 7%. Las células se dividieron en alícuotas y se congelaron en nitrógeno líquido en tubos de 1,5 mL autoclavados y fueron mantenidos a -80°C hasta su uso.

2.2 Transformación de *Escherichia coli*.

A 50 μ L de células competentes descongeladas en hielo se le agregaron 10 ng de ADN plasmidial o 5 μ L de una ligación, y se incubaron en hielo por 30 min. Luego se les dio un choque térmico a 42°C por 30 s o a 37°C por 5 min, para luego crecer las bacterias en medio LB (extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L) por 1 h a 37°C.

Las células se resuspendieron y se plaquearon en medio LB sólido con los antibióticos que correspondan la selección deseada. En el caso de la selección de colonias DH5 α transformadas con vectores compatibles para la selección de colonias blancas/azules (pGEM-T, pBluescript), a las placas LB-antibiótico además se les agrega 10 μ L de IPTG 1 M más 5-10 μ L X-Gal sobre la placa lista y se rastrilló. Las colonias aparecen luego de ser crecidas toda la noche a 37°C.

2.3 Células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

A partir de un cultivo de noche de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 (Gen^R, Rif^R) se inocularon 50 mL de medio LB, el cual se crece a 28°C hasta que alcanza una DO₆₀₀ = 0,5-0,6. Luego las células se enfriaron por 10 min en hielo y se centrifugaron a 3000 g por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 mL de una solución preenfriada y estéril de CaCl₂ 20 mM. Las células se dividieron en alícuotas en volúmenes de 100 μ L en tubos de 0,75 mL y se congelaron en nitrógeno líquido. Las células fueron mantenidas a -80°C hasta su uso.

2.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

A 100 μ L de células competentes descongeladas en hielo, se les agregó 1 μ g de ADN plasmidial y se congelaron en nitrógeno líquido por cinco minutos. Luego se descongelaron a 37°C por 25 min. Luego las bacterias se crecieron a 28°C por 3 h en medio LB suplementado con los antibióticos apropiados para la selección de la cepa.

En el presente trabajo se usó la cepa GV3101 que se crece en medio suplementado con Gentamicina 100 ng/ μ L y Rifampicina 10 ng/ μ L. Luego de crecer las bacterias por 3 h, se precipitaron y plaquearon en placas LB con los antibióticos de selección de la

cepa y del vector. En placa, las bacterias se crecieron a 28°C por 2 días hasta que las colonias se hicieron visibles.

3. Trabajo con Plantas.

3.1 Cultivo de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas con etanol 70% por un minuto, luego con cloro comercial por un minuto y luego se lavaron con agua estéril tres veces. Las semillas se conservaron en 1 mL de agua y se incubaron por 2-5 días a 4°C en oscuridad para inducir y sincronizar la germinación, hasta su siembra. El cultivo *in vitro* de *A. thaliana* se realizó en medio 0,5X MS (2,14 g/L), sacarosa 1%, MES 250 mg/L, pH 5,7. Para cultivo en medio sólido se agregaron 9 g/L de agar al medio antes de autoclavar. Las plantas fueron crecidas en una cámara de cultivo con temperatura controlada de 21°C y un fotoperíodo de luz-oscuridad de 16-8 h. El cultivo en tierra se realizó en un sustrato estéril por autoclave, que correspondió a una proporción de tierra de litro: vermiculita 3:2. Lo habitual fue cultivar las plantas en medio MS sólido donde es posible adicionar antibióticos o revisar algunos fenotipos antes de hacer el traspaso a tierra.

3.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Se usó el método de inmersión floral descrito por Clough y Bent, 1999, con algunas modificaciones. Se inocularon 100 mL de LB con antibióticos apropiados para la selección de la cepa y del vector con 100 µL de un cultivo de noche de *Agrobacterium tumefaciens* que porta el constructo de interés. El cultivo debe crecer a 28°C con agitación constante hasta que alcanzó una D.O.₆₀₀ mayor a 0,8. Las células se

Tabla II. Mutantes en las proteínas PIN y otros usados en el presente trabajo.

Nombre	Locus	Resistencia	Características
<i>pin1-201</i>	At1g73590	kanamicina	Mutante insercional Salk_047613. La inserción se encuentra en el tercer intrón. El mutante homocigoto presenta flores infértiles o inflorescencias desnudas en forma de alfiler, por lo que el mutante se mantiene heterocigoto. Además en etapas tempranas, la plántula puede desarrollar uno o tres cotiledones, o dos cotiledones orientados en un plano, o en algunos casos más severos no desarrollan cotiledones.
<i>pin1-1ttg1</i>	At1g73590 At5g24520	-	Presenta una mutación en el gen <i>Pin1</i> . El mutante homocigoto para la mutación presenta los mismos fenotipos descritos para el mutante <i>pin1-201</i> . La mutación en el locus <i>testa glabra1 (ttg1)</i> en su estado homocigoto se manifiesta con la ausencia total de tricomas en la planta que para efectos de selección de cruces resulta ser una buena herramienta.
<i>eir1-1</i>	At5g57090	-	Mutante puntual con diepoxibutano. Mutante agravitrópico, cuyo fenotipo se restringe a la raíz.
<i>pin2-1</i>	At5g57090	kanamicina	Mutante insercional Salk_042899, la inserción se encuentra en el quinto intrón, en la posición +2572. Las plantas homocigotas son agravitrópicas en la raíz.
<i>pin2-2</i>	At5g57090	kanamicina	Mutante insercional Salk_144447, la inserción se encuentra en el tercer exón, en la posición +1298. Las plantas homocigotas son agravitrópicas en la raíz.
<i>pin2-3</i>	At5g57090	kanamicina	Mutante insercional Salk_122916, la inserción se encuentra en el primer intrón, en la posición +366. Las plantas homocigotas son agravitrópicas en la raíz. La inserción del T-DNA en este locus fue confirmada por PCR.
<i>pin3-4</i>	At1g70940	kanamicina	Mutante insercional CS9363, tiene la inserción en la posición +574, en el primer exón. El mutante presenta deficiencias en la elongación celular, lo que se refleja en una raíz e hipocotilos más cortos. Además tiene una respuesta gravitrópica alterada tanto de raíz como de hipocotilo, así como una respuesta fototrópica disminuida.
<i>pin3-5</i>	At1g70940	kanamicina	Mutante insercional CS9364, tiene la inserción en el 5' UTR. El mutante presenta deficiencias en la elongación celular, lo que se refleja en una raíz e hipocotilos más cortos. Además tiene una respuesta gravitrópica alterada tanto de raíz como de hipocotilo, así como una respuesta fototrópica disminuida. La inserción del T-DNA fue confirmada por PCR.
DR5rev:GFP	-	sulfadiazina	La planta tiene la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor sintético de respuesta a auxina DR5rev. Este promotor tiene repetido 9 veces el elemento de unión a factores de respuesta a auxina (ARF) 5'-CCTTTTgTCTC unido a las primeras 47 pb del promotor mínimo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Además la proteína GFP tiene una señal de destinación y una de retención en el retículo.

centrifugaron por 10 min. a 7500 rpm y se resuspendieron en 100 mL de una solución con sacarosa 10%, Silwett-77 0,05%. En esta solución las se sumergieron por 20 s las inflorescencias de plantas de 6-7 semanas a las que se le retiraron las silicuas y las flores abiertas. Una vez hecho esto, las plantas se cubrieron con plástico para

conservar una alta humedad y se dejaron en oscuridad por 16-24 h. Luego se pasaron a la cámara de crecimiento y se regaron hasta que las silicuas comenzaron a secarse. Este protocolo típicamente dio entre un 0,1-1% de eficiencia de transformación.

3.3 Obtención de plantas mutantes y líneas transgénicas.

Las semillas mutantes para los genes *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*, y la planta transgénica DR5rev:GFP fueron obtenidas de los bancos de semillas del ABRC o de RIKEN BRC (Tabla II). Los mutantes *pin1-1 ttg1*, *pin1-201* (Furutani y col., 2004), *eir1-1* (Lusching et al., 1998), *pin3-4* y *pin3-5* (Friml y col., 2002a) y DR5rev:GFP (Ottenschlager y col., 2002) fueron caracterizados anteriormente. Las líneas *pin2-1*, *pin2-2* y *pin2-3* son mutantes SALK insercionales obtenidos del banco de ABRC. Para todos los mutantes insercionales se diseñaron partidores que flanquean el T-DNA para con ellos confirmar el lugar de inserción y además definir homocigocidad y heterocigocidad en base a ellos.

Para generar las líneas mutantes con los constructos descritos en Materiales y Métodos 1.3 y 1.5 se transformaron entre 12 y 18 plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Columbia usando el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1999). Dependiendo de la resistencia otorgada por el vector, las semillas de las plantas transformadas se sembraron en medio MS sólido adicionado con Kanamicina 100 µg/mL (vectores pderivados de pBI101.3) o Higromicina 75 µg/mL (vectores derivados de pCAMBIA.GUS.E9), más Ampicilina 100 µg/mL para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium*. Luego de dos semanas es posible diferenciar aquellas plantas que son capaces de crecer en medio de selección, las cuales se traspasaron a tierra para recolectar sus semillas. Estas semillas corresponden a la generación T₁. Dentro de estos conjuntos de semillas se seleccionó aquella línea que tenía una segregación de

3:1 en la generación T2 en el antibiótico de selección, indicativo de la presencia de un sólo inserto en el genoma, la cual se llevó a la siguiente generación T3 para escoger plantas no segregantes para la resistencia al antibiótico, que corresponden a plantas homocigotas para la inserción. Habitualmente se sembraron entre 150-200 semillas por línea, las que se contabilizaron y sometieron al test de chi cuadrado para determinar la validez estadística del análisis (Tablas III y IV).

3.4 Cruces dirigidos de los mutantes *pin*.

Se escogieron flores que aún no abrían, idealmente con pétalos asomados. De esta forma nos aseguramos que la planta aun no ha llegado a la antesis, es decir, la maduración del polen no ha ocurrido por lo que nos aseguramos de trabajar con flores vírgenes. Con un par de pinzas finas, se abre la flor y se retiraron todas las estructuras masculinas ("emascular"), además de pétalos y sépalos, quedando al descubierto sólo el carpelo femenino. Una vez hecho esto, se tomó una flor de la planta con la que se iba a cruzar y se separaron los estambres. Si el polen está maduro se puede ver a simple vista la presencia del polen como un polvo amarillo sobre la antera. Con los estambres tomados con una pinza se tocó suavemente con la antera el estigma de la flor emasculada, quedando sobre él el polen. El cruce se marcó haciendo un lazo con un hilo fino en la base del estigma. El éxito del cruce se puede ver a las 48 h al observar que la silicua comienza a desarrollarse. El estigma maduro que inició a secarse se retiró a los 12-14 días.

4. Otros Ensayos

4.1 Ensayo de actividad GUS.

El protocolo fue adaptado de Lehman y *col.*, 1996. Plántulas de 4-7 días post-germinación (DPG) fueron fijadas por 20 min en vacío suave (20 mm Hg) en una

solución formaldehído 3,7% en tampón sodio-fosfato 100 mM pH 7,0. Las plantas fijadas se lavaron cinco veces en exceso de tampón sodio-fosfato. La tinción con GUS se realizó toda la noche (12-16 h) a 37°C en tampón de tinción (100 mM NaPO₄, 10 mM EDTA, 0,5 mM K₄Fe(CN)₆, 0,5 mM K₃Fe(CN)₆, 1% Triton X-100, 1 mM ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl β-D glucurónico (X-Gluc)) después de una infiltración en vacío por 2 min. Luego las plantas se montaron en cloral hidrato 50 % y fueron visualizadas usando microscopia DIC en un microscopio invertido Olympus IX70.

4.2 Diseño de péptidos para la construcción de anticuerpos policlonales.

El estudio informático de las secuencias de aminoácidos de los componentes de la familia PIN muestra dos regiones hidrofóbicas en amino- y en carboxilo-terminal con una alta homología en sus secuencias, unidas por una región hidrofílica altamente variable (Figura 2). Sobre esta última se han generado anticuerpos policlonales, los cuales se han usado para detectar la localización *in vivo* de algunos de los componentes (Galweiler y *col.*, 1998; Müller y *col.*, 1998; Friml y *col.*, 2002a; Friml y *col.*, 2002b; Friml y *col.*, 2003a).

Sobre esta región hidrofílica se escogieron péptidos pequeños para PIN1, PIN2 y PIN3 con el fin de hacer anticuerpos policlonales usando un algoritmo que determina zonas de "alta antigenicidad" en base a los parámetros fisicoquímicos de flexibilidad, hidrofiliidad y accesibilidad determinados experimentalmente para cada uno de los aminoácidos, así como la frecuencia de cada uno de ellos de encontrarse en zonas antigénicas de proteínas conocidas (Kolaskar y *col.*, 1990). El algoritmo está disponible en el software "*Antigen design tool*" de la página web www.genescript.com. En base a este programa se determinaron tres o cuatro péptidos antigénicos de 14 a 16 aminoácidos en la región hidrofílica de PIN1, -2 y -3, dentro de los cuales se escogió el

que no tuviera homología a nivel de secuencia con el resto de los componentes de la familia. Contra estos péptidos se mandaron a hacer anticuerpos policlonales en conejo a la empresa BiosChile Ingeniería Genética S.A. Entre 3-5 mg de péptido (se requiere de alta pureza, como fue en este caso) fueron inoculados en 2 conejos junto con la cantidad suficiente de adyuvante de Freund completo para la primera inoculación e incompleto para las tres siguientes. Los péptidos fueron acoplados a *Blue Carrier*[®] para aumentar la inmunogenicidad del antígeno. El éxito del protocolo se comprobó haciendo ensayos de ELISA contra el péptido sintético. La tercera y quinta sangría se usaron para los ensayos siguientes.

4.3 Purificación de anticuerpos policlonales usando cromatografía de afinidad.

La Sefarosa acoplada a bromuro de cianógeno (Sph-CNBr, Amersham) es una matriz pre-activada que reacciona con grupos amino primarios de proteínas y otras moléculas. Usando esta resina se purificaron los sueros policlonales antiPIN1 y antiPIN2. Se lavó abundantemente 0,5 g de resina de Sph-CNBr con una solución HCl 0,07 % pH 2,5, y luego 3 veces con tampón de unión (NaHCO₃ 0,5 M, NaCl 0,5 M). Se retiró el exceso de líquido y se agregó 1 mg de péptido disuelto en 1 mL de tampón de unión y se incubó toda la noche con agitación suave a temperatura ambiente. Luego la resina se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Se lavó tres veces con 5 volúmenes de tampón de unión. Luego se agregaron 5 volúmenes de etanolamina 1 M pH 8,0 y se incubó con agitación suave por 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces alternativamente con tampón acetato (acetato de sodio 0,1 M, NaCl 1 M, pH 4) y tampón borato (ácido bórico 1 M, NaCl 1 M pH 8). Luego se equilibró la columna en PBS 0,1 M (Na₂HPO₄ 1,09 g/L, NaH₂PO₄ 0,32 g/L, NaCl 90 g/L, pH 7,2) más azida de sodio 0,1%. En este paso se realizó una elusión del péptido no unido covalentemente usando 1 volumen de glicina

0,1 M pH 2,5 cada vez, haciendo cuatro o cinco repeticiones dependiendo de la eficiencia de unión. La columna equilibró en PBS, azida de sodio 0,1%. A esta resina se le denominó "resina de afinidad".

La resina de afinidad se incubó toda la noche a 4°C con 2 mL de suero inmune más 2 mL de PBS. Luego se lavó el material no unido 3 veces con PBS y una vez con tampón sodio-fosfato 20 mM pH 6,8. Luego se eluyó el anticuerpo unido al péptido cinco veces con 0,5 mL de glicina 0,1 M pH 2,5. Las fracciones colectadas se neutralizaron con 40 μ L de NaHCO₃ y se eliminó la Sepharosa residual por centrifugación. Se ajustó pH 7 y se cuantificó la cantidad de proteína. Se agregó glicerol hasta que quedó 50 %, BSA hasta 2 mg/mL y se agregó azida de sodio hasta 0,1 %. Por conveniencia, se dividió el anticuerpo purificado en alícuotas para descongelar y usar sólo lo necesario.

4.4 Extracción de proteínas de *Arabidopsis thaliana*.

La extracción de proteínas totales se realizó de la siguiente forma. Tres plantas de 11 DPG se molieron a temperatura ambiente en tampón E (Tris-HCl 125 mM, SDS 1%, glicerol 10%, Na₂S₂O₅ 50 mM, pH 8,8). Luego se centrifugó a 13000 g por 10 min. Del sobrenadante se apartó una alícuota para estimar la concentración de proteínas y al resto se le agregó 0,1 volumen de tampón Z (Tris-HCl 125 mM, SDS 12%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 22%, azul de bromofenol 0.001%, pH 6,8) antes de cargar un gel de poliacrilamida.

La extracción de fracción microsomal de plantas completas se realizó siguiendo el siguiente protocolo. Plantas de tres semanas crecidas en medio líquido MS 0,5X fueron homogeneizadas en hielo en tampón de extracción (KH₂PO₄ 100 mM, MgCl₂ 0,05 mM, sacarosa 16% e inhibidores de proteasas PMSF, Leupeptina, Aprotinina). El homogeneizado se filtró en Miracloth® y se centrifugó por 5 min a 1000 g para precipitar

las células no rotas, mitocondrias y núcleos. Luego se centrifugó a 10000 g a 4°C por 20 min para precipitar los cloroplastos. Posteriormente se centrifugó el sobrenadante a 100000 g por 50 min a 4°C. El precipitado corresponde a la fracción microsomal. Este se resuspendió en tampón STM (sacarosa 8,56%, MgCl₂ 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) y se cuantificó la concentración de proteínas usando el ensayo colorimétrico de la reacción de ácido bicinonínico (BCA) con Cu⁺²/Cu⁺³.

4.5 Western blot.

30 µg de proteína total o de fracción microsomal de *Arabidopsis thaliana* fueron corridos en un gel de poliacrilamida 10 % y transferidos a una membrana de PVDF. Luego la membrana fue incubada por 1-2 h en 1% BSA/leche 3% en PBS. Posteriormente se lavó tres veces por 10 min en PBS/0,05 % Tween-20 y se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS/2% BSA por 2-3 h con agitación suave. Luego la membrana se lavó por 15 min 3 veces en PBS/0,05 % Tween 20 y se incubó 1,5 h con el anticuerpo antiIgG de conejo acoplado a peroxidasa, diluido 1/5000 en 2% BSA/PBS. Luego se lavó abundantemente en 0,05 % Tween-20/PBS y la membrana se reveló en un cuarto oscuro usando una solución de Luminol, ácido cumárico y peróxido de hidrogeno en Tris HCl 100 mM pH 8,5.

4.6 Inmunolocalización en planta completa.

El protocolo fue adaptado de Friml y col., 2003b. Plantas de tres a siete días post-germinación (DPG) fueron fijadas por dos horas en una solución paraformaldehido 4-% en tampón MTSB (PIPES 50 mM, EGTA 5 mM, MgSO₄ 5 mM, pH 7) en vacío suave (20 mm Hg). Las plantas fueron lavadas tres veces en MTSB/0,1 % Tritón X-100 y dos veces con agua destilada. Luego las plantas fueron incubadas a 37°C en driselasa 2%

en MTSB por 15-30 min. Este tiempo es crucial y depende de la edad de la planta. Después de lavar dos veces con MTSB/0,1 % Tritón X-100, las plántulas fueron incubadas por una hora en 10 % DMSO/3 % IGEPAL en MTSB por 1 h. Luego se lavó tres veces con MTSB/0,1 % Tritón X-100 y se incubó por 1 h a 37°C en tampón de bloqueo (3 % BSA en MTSB).

Las plántulas permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo purificado por afinidad diluido en tampón de bloqueo toda la noche a 37°C. Luego se lavó prolijamente cinco veces en MTSB/0,1 % Tritón X-100 y se incubó con el antiIgG de conejo acoplado a Alexa 488 por 2 h a 37°C, diluido 1/400 en tampón de bloqueo. Luego las muestras fueron lavadas otras cinco veces MTSB/0,1 % Tritón X-100 y montadas en glicerol 50 % hasta su visualización. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 con un láser de excitación de 488 nm, un filtro dicróico HFT488 y un filtro de emisión BP505-550.

RESULTADOS.

Los promotores de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* determinan dos regiones excluyentes de expresión en la raíz primaria.

Las fusiones de los promotores de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* al gen *uidA*, que codifica la proteína reportera β -glucouronidasa (GUS) permiten determinar los sitios de actividad de los promotores *in situ*. Las fusiones se realizaron en el vector pSL3 que contiene el codón de inicio ATG del gen *uidA* en la secuencia consenso para el inicio de la traducción en plantas (Figura 4A). Además el uso del sitio de corte NcoI, que contiene un ATG en su secuencia, permitió generar fusiones traduccionales entre los promotores y el gen reportero *uidA* (vectores pSL3.pPINX, Figura 4A). Las fusiones pPINX:GUS fueron movilizadas junto al terminador E9 dentro del T-DNA del vector binario pBI101.3, reemplazando el cassette GUS-NosT, generándose los vectores pBI.pPINX (Figura 4D). Estos vectores se utilizaron para transformar plantas silvestres (según Materiales y Métodos) donde se hizo el estudio genético para seleccionar plantas homocigotas con una inserción en su genoma usando la resistencia a kanamicina presente en el T-DNA como marcador de selección (Tabla III) para determinar mediante la actividad de GUS los dominios de actividad de los promotores en la raíz de la planta.

Plantas de 4 a 7 DPG de las líneas transgénicas pPINX:GUS fueron sometidas al ensayo de actividad de GUS y visualizadas usando microscopia DIC (Figura 5). El constructo pPIN1:GUS muestra una expresión fuerte en la vasculatura central de la raíz primaria (Figura 5A-B), además en las raíces laterales incipientes (Figura 5C), mientras que pPIN3:GUS se expresa en las células de la columella y en la vasculatura,

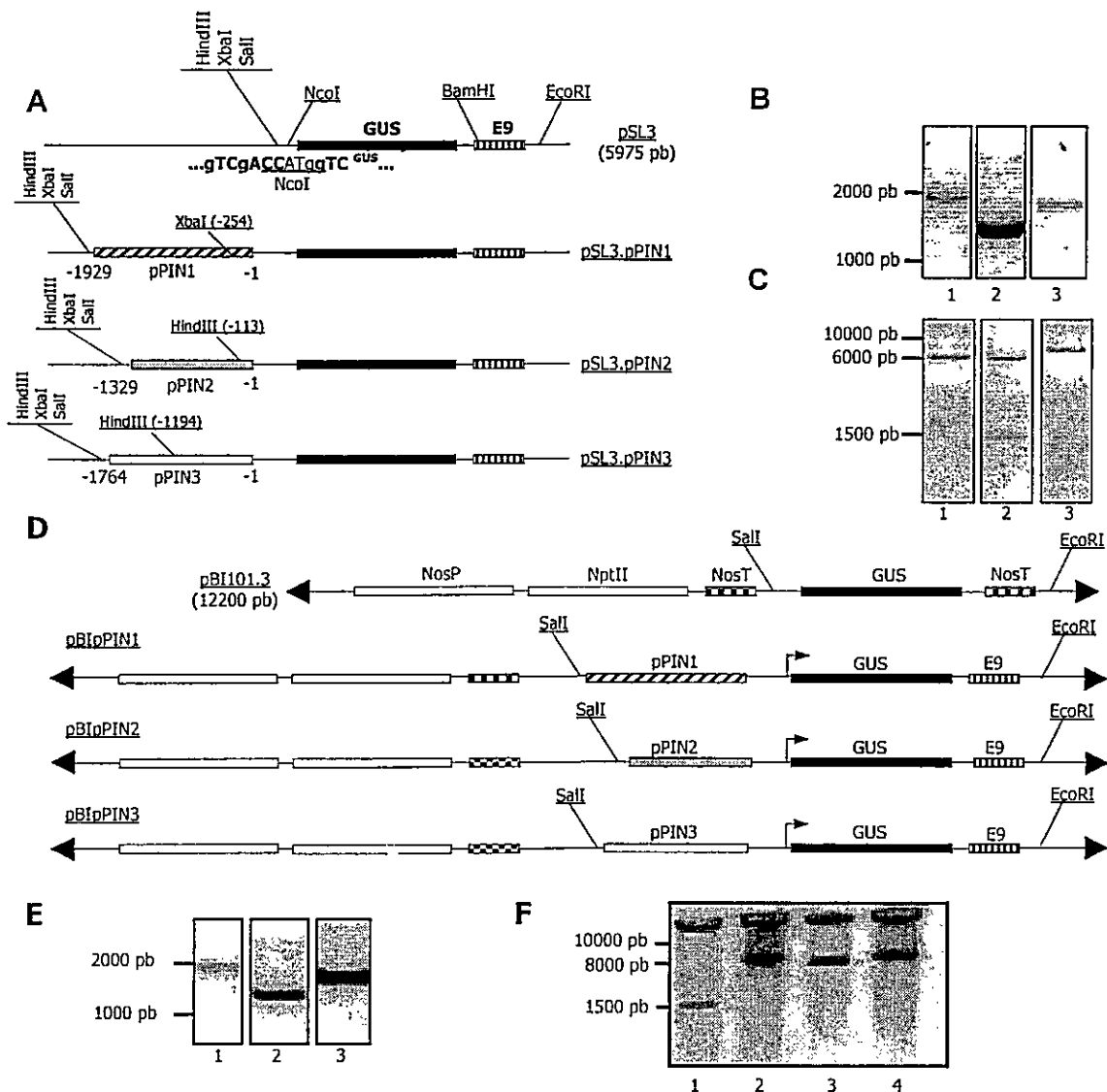


Figura 4. Generación de fusiones traducciónales entre el gen reportero GUS y los promotores de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*. A. El vector pSL3 contiene un sitio consenso de plantás para el inicio de la traducción y el sitio NcoI en el codón de inicio ATG de GUS, por lo que aquí se generan fusiones traducciónales de los promotores con el gen uidA. Los promotores clonados en pGEM-T (según Materiales y Métodos 1.1) fueron movilizados como fragmentos Sall/NcoI dentro del vector pSL3 digerido con las mismas enzimas de restricción, generándose las fusiones promotor:GUS:E9 (vectores pSL3.pPIN1, pSL3.pPIN2, pSL3.pPIN3). B. PCR de los promotores usando como templado los vectores pSL3.pPINX y los mismos partidores usados para clonar los promotores (Materiales y Métodos 1.1). 1: pSL3.pPIN1; 2: pSL3.pPIN2; 3: pSL3.pPIN3. C. Digestión de los vectores pSL3.pPINX con las enzimas mostradas en A. 1: pSL3.pPIN1 XbaI; 2: pSL3.pPIN2 HindIII; 3: pSL3.pPIN3 HindIII. D. Las fusiones pPINX-GUS-E9 fueron movilizadas con las enzimas Sall y EcoRI dentro de los mismos sitios del T-DNA del vector binario pBI101.3, vector apto para transferir genes dentro del genoma de plantas. E. PCR para amplificar los promotores (partidores usados para clonarlos, según Materiales y Métodos 1.1) usando como templado los vectores pBI101.pPINX. 1: pBI101.pPIN1; 2: pBI101.pPIN2; 3: pBI101.pPIN3. F. Digestión doble de los vectores pBI101.pPINX con las enzimas Sall y EcoRI. 1: pBI101.3; 2: pBI101.pPIN1; 3: pBI101.pPIN2; 4: pBI101.pPIN3.

Tabla III. Análisis de segregación de la resistencia a kanamicina en las plantas transgénicas con los constructos promotor:GUS.

Planta	Res [#]	Sen [#]	Total	Razón	χ^2
pPIN1:GUS.2a	177	60	237	2,95:1	0,0127
pPIN1:GUS.2d	74	24	98	3,08:1	0,0136
pPIN1:GUS.2e	164	55	219	2,98:1	0,0015
pPIN2:GUS.1c	153	49	202	3,12:1	0,0594
pPIN2:GUS.2c	156	50	206	3,12:1	0,0583
pPIN3:GUS.1a	153	50	203	3,06:1	0,0148
pPIN3:GUS.3a	120	42	162	2,86:1	0,0741
pPIN3:GUS.2i	223	77	300	2,90:1	0,0711

^a Plantas silvestres transformadas con las fusiones de los promotores al gen reportero GUS, generación T2. Los números y letras que siguen después del punto en el nombre de las plantas indican dos generaciones sucesivas de autopolinización.
[#] Número de plantas resistentes (Res) o sensibles (Sen) a crecer en 0,5X MS con kanamicina 100 µg/mL de plántulas de 11 DPG.
 Distribución de chi cuadrado con un grado de libertad, nivel de significación 1- α > 0.9

Tabla IV. Análisis de segregación de la resistencia a higromicina en las plantas transgénicas con los constructos del intercambio de promotores.

Planta ^a	Res [#]	Sen [#]	Total	Razón	χ^2
wt 1:1.1A	103	36	139	2,86:1	0,0600
wt 1:2.5A	124	44	168	2,82:1	0,1270
wt 1:2.5B	133	43	176	3,09:1	0,0303
wt 1:3.6A	135	48	183	2,81:1	0,1475
wt 1:3.6B	100	36	136	2,78:1	0,1569
wt 1:3.3C	98	35	133	2,80:1	0,1228
wt 2:1.5A	114	40	154	2,85:1	0,0779
wt 2:1.4B	145	49	194	2,96:1	0,0069
wt 2:1.5C	122	35	157	3,49:1	0,6136
wt 2:2.1A	148	47	195	3,15:1	0,0838
wt 2:2.1B	135	40	175	3,38:1	0,4286
wt 2:3.6A	140	45	185	3,11:1	0,0450
wt 2:3.6B	121	44	165	2,75:1	0,2444
wt 2:3.6C	103	39	142	2,64:1	0,4601
wt 3:1.5A	111	40	151	2,78:1	0,1788
wt 3:1.4B	170	55	225	3,09:1	0,0370
wt 3:2.2A	124	44	168	2,82:1	0,1270
wt 3:2.2B	140	43	183	3,26:1	0,2204
wt 3:3.6A	115	42	157	2,74:1	0,2569
wt 3:3.4B	126	43	169	2,93:1	0,0178
wt GUS.E9.5A	108	38	146	2,84:1	0,0822

^a Plantas silvestres transformadas con los constructos del intercambio de promotores (vectores pCAMBIA.FUSIONES), generación T2: Los números y letras que siguen después del punto en el nombre de las plantas indican dos generaciones sucesivas de autopolinización.
[#] Número de plantas resistentes (Res) o sensibles (Sen) a crecer en 0,5X MS con higromicina 75 µg/mL de plántulas de 11 DPG.
 Distribución de chi cuadrado con un grado de libertad, nivel de significación 1- α > 0.9

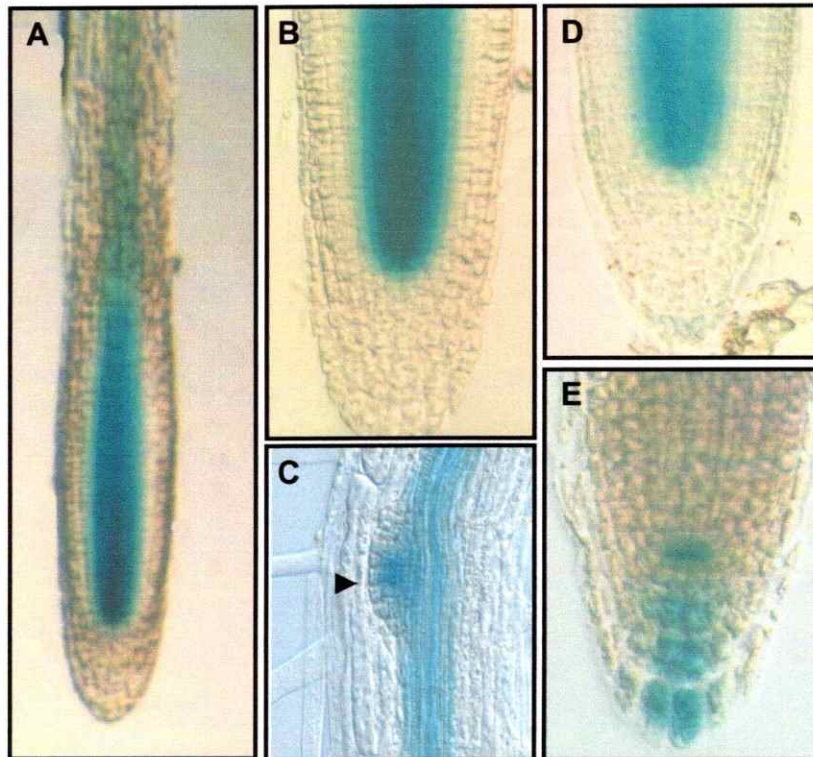


Figura 5. Los promotores *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* tienen distintos sitios de actividad en la raíz de *Arabidopsis*. Plantas de 4 DPG fueron teñidas por 5 h en una solución 1 mM X-Gluc, montadas en cloral hidratado 20 % y visualizadas con microscopía DIC (según Materiales y Métodos 4.1). La actividad de los constructos pPIN1:GUS (A, B, C) y pPIN2:GUS (D) tienen los mismos patrones, restringiéndose a la vasculatura de toda la planta, además de los primordios de las raíces laterales (▶) (C). El constructo pPIN3:GUS (E) tiene la actividad en la columella y la región meristemática

salvo en la región de diferenciación de la raíz primaria (Figura 5E). El promotor pPIN2 tiene un dominio de expresión idéntico al del promotor de PIN1, es decir, en la vasculatura de toda la planta (Figura 5D) y en las raíces laterales incipientes. Estos tres promotores determinan dos dominios de expresión adyacentes en región de diferenciación de la raíz primaria que no se solapan, y fueron usados para los siguientes ensayos.

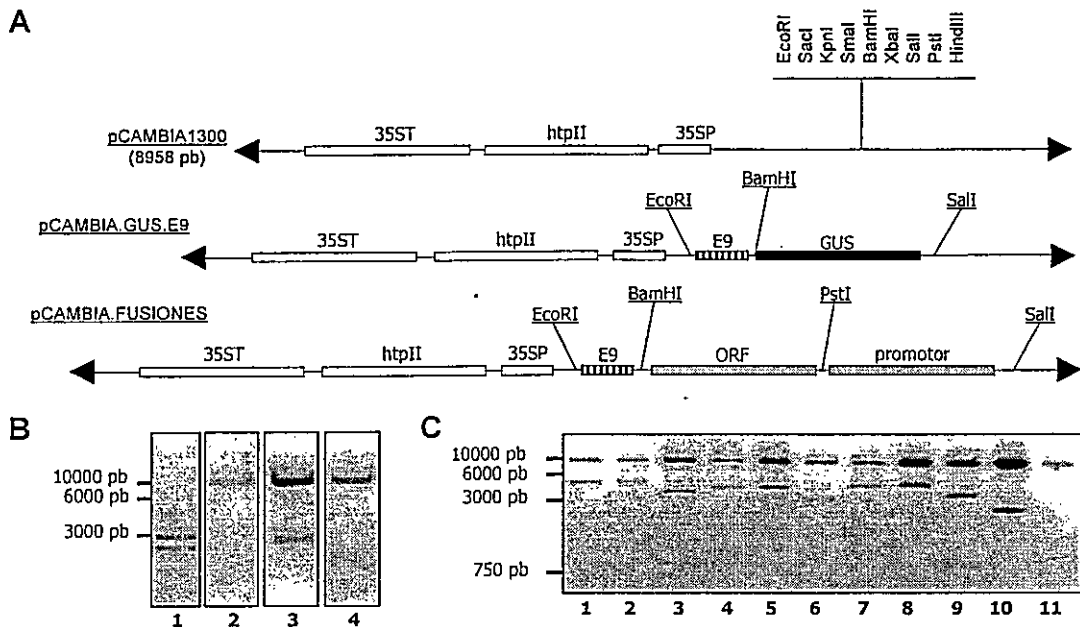


Figura 6. Intercambio de promotores entre *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*. A. El vector pCAMBIA1300 es un vector binario de alto número de copias que tiene en su T-DNA sólo el cassette que otorga resistencia a Higromicina en plantas (promotor y terminador CaMV35S, gen resistencia a Higromicina *htpII*). A partir de él se construyó el vector pCAMBIA.GUS.E9 insertando la secuencia codificante del gen GUS y el terminador E9 provenientes del vector pSL3 usando los sitios de corte *Sall* y *EcoRI* (Figura 4A). Dentro de los sitios únicos *BamHI* y *Sall* del vector pCAMBIA.GUS.E9 se insertaron las fusiones promotor:ORF de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*, generándose los vectores pCAMBIA.FUSIONES (Ver Anexo 1, Tabla V). B. La digestión doble con las enzimas *Sall* y *EcoRI* del vector pSL3 libera el cassette GUS:E9 (carril 1, banda 3000 pb), el que fue movilizado al vector pCAMBIA1300 digerido con las mismas enzimas (carril 2). La misma doble digestión sobre el vector pCAMBIA.GUS.E9 libera el fragmento GUS:E9 (carril 3, banda de 3000 pb), que contiene un sitio *BamHI* entre el gen GUS y el terminador E9, evidenciado por la doble digestión con *Sall* y *BamHI* (carril 4). C. La doble digestión de los vectores pCAMBIA.FUSIONES con las enzimas *Sall* y *EcoRI* libera un fragmento correspondiente a la fusión promotor:ORF:E9 (banda de 5900 pb aprox.). Las fusiones de los promotores al oPIN3 además se libera una tercera banda debido a un sitio de corte *EcoRI* en 1669 pb del ORF. 1: pCAMBIA.1:1; 2: pCAMBIA.1:2; 3: pCAMBIA.1:3, 4: pCAMBIA.2:1, 5: pCAMBIA.2:2; 6: pCAMBIA.2:3; 7: pCAMBIA.3:1; 8: pCAMBIA.3:2, 9: pCAMBIA.3:3; 10: pCAMBIA.GUS.E9; 11: pCAMBIA1300.

Intercambio de Promotores entre *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*.

El intercambio de promotores se realizó entre los promotores mostrados anteriormente y los ORFs de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3*. Los ORFs de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* se amplificaron por PCR desde clones disponibles en ABRC y RIKEN BRC (Tabla I) y se clonaron en pGEM-T donde se secuenciaron para verificar la ausencia de mutaciones. En los

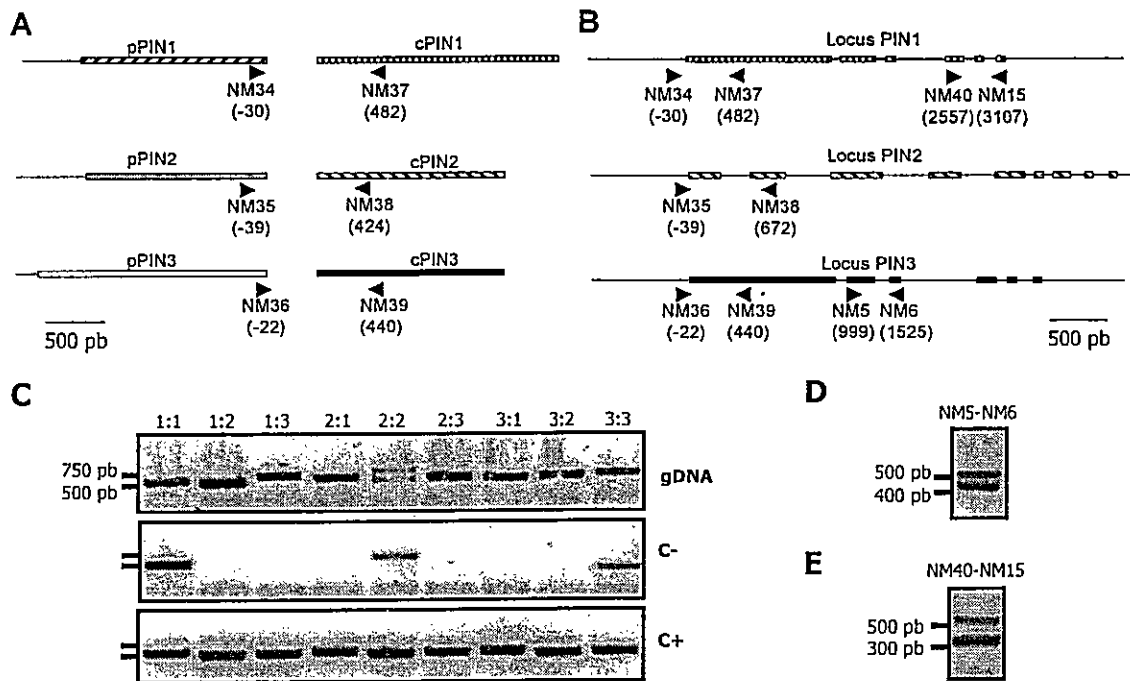


Figura 7. Los marcadores moleculares para los constructos del *intercambio de promotores* permiten genotipar las plantas transgénicas. **A.** Se diseñaron partidores (▶) para confirmar mediante PCR la presencia de cada uno de los constructos del *intercambio de promotores* en el genoma de la planta. Se diseñó uno *directo* en el promotor y uno *inverso* en el ORF, de modo que las combinaciones entre ellos permiten confirmar la presencia de todas las fusiones en la planta transgénica correspondiente. **B.** Esquema de intrones y exones de los locus *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* y la ubicación de los mismos partidores mostrados en **A**. Entre paréntesis en **A** y **B** se encuentra indicado el lugar de ubicación del 5' del partidor en la secuencia nucleotídica que corresponde. **C.** PCR usando los partidores mostrados en **A** y **B** y gDNA extraído de las plantas homocigotas transformadas con los vectores del intercambio de promotores como templado (Tabla IV, Figura 6A). Las plantas analizadas amplifican un fragmento de 500 pb aprox., lo que indica que tienen el constructo indicado (por ejemplo, 1:1 corresponde a la fusión promotor PIN1 con el ORF de PIN1, vector pCAMBIA.1:1, planta wt1:1). Nótese que los controles negativos (C- gDNA planta pCAMBIA.GUS.E9) para las plantas 1:1, 2:2, 3:3 dan una banda que corresponde a la amplificación desde el locus (ver **B**). En el caso de 2:2, los partidores NM35-NM38 flanquean un intrón de 248 pb lo que permite diferenciar el constructo del locus. Los controles positivos corresponden a los vectores pCAMBIA.FUSIONES. **D** y **E.** PCR usando los partidores NM5-6 y el gDNA de las plantas wt PIN3:3 (**D**) y NM40-15 y el gDNA de las plantas wt PIN1:1 (**E**), los que permiten diferenciar los productos de PCR del locus y del constructo, ya que flanquean regiones intrónicas. La información de los partidores usados se presenta en la Tabla VI.

partidores se incluyeron sitios de corte para enzimas de restricción que permiten hacer todas la combinaciones entre los promotores y los ORFs de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* (Figura 6, para más detalles ver Materiales y Métodos). Así se generaron fusiones

traduccionales dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 (Figura 6, Anexo 1) y que permiten la posterior transformación estable en planta.

La transformación estable de todos los constructos del *intercambio de promotores* en *A. thaliana* se realizó sobre plantas silvestres *ecotipo* Columbia, donde se llevó a cabo todo el estudio genético para determinar la presencia de una inserción homocigota en el genoma de la planta mediante la segregación de la resistencia a higromicina (Tabla IV) para luego generar los dobles mutantes con las líneas *pin1-201* y *pin2-3*. Una planta tiene una sola inserción en el genoma si la segregación de la resistencia a higromicina en la generación 2 (T2) es 3 : 1 respecto a las plantas sensibles. Estas plantas con una inserción se autopolinizaron y se buscó plantas homocigotas (100% resistentes) en la siguiente generación T3. Obtenidas plantas con una sola inserción y homocigotas se extrajo DNA genómico (gDNA) y se verificó la presencia de la fusión correcta con marcadores moleculares (Figura 7). La combinación de 6 partidores específicos (Figura 7A, B), uno directo para cada promotor y uno inverso para cada ORF, permiten verificar perfectamente la presencia del constructo y además de diferenciarlo, en el caso de los constructos 1:1, 2:2 y 3:3, del locus en cuestión (Figuras 7C-E). Estos marcadores moleculares permiten además seguir el transgen en los posteriores cruces entre estas plantas y los mutantes nulos *pin1-201*, *pin2-3* y *pin3-5*.

Cruces entre los mutantes *pin1-201*, *pin2-3* y *pin3-5* y las líneas transgénicas del intercambio de promotores.

Las plantas *pin1-201*, *pin2-3* y *pin3-5* son mutantes insercionales Salk disponibles en ABRC (Tabla II). El mutante *pin1-201* tiene la inserción en el tercer intrón del locus At1g15690, lo cual fue confirmado con marcadores moleculares utilizando PCR (Figura

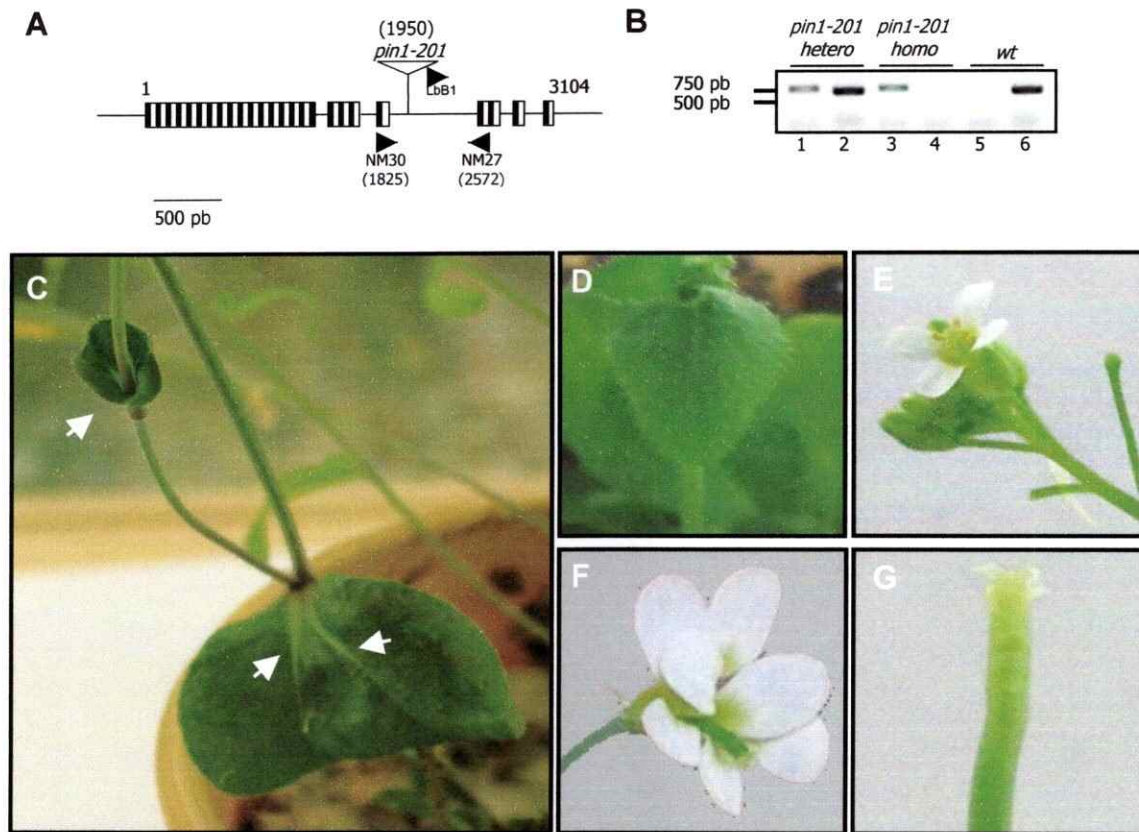


Figura 8. El mutante *pin1-201* presenta fenotipos relacionados con la pérdida del transporte polar de auxina en el meristema floral y en el sistema vascular. A. Esquema de exones (■) e intrones (líneas) del locus *pin1*, donde se muestra el lugar de la inserción del T-DNA en el mutante *pin1-201* y los partidores (◄) usados para confirmar la inserción. **B.** Se muestra un PCR usando los partidores mostrados en A. En carriles impares (1, 3, 5) se usaron los partidores LbB1 y NM27, y en los carriles pares (2, 4, 6) los partidores NM27 y NM30. **C.** El mutante insercional *pin1-201* desarrolla hojas fusiformes (flechas) y cotiledones dobles (no mostrados) generado por la bifurcación del sistema vascular. **D.** Hoja caulinar de la planta silvestre. **E.** Flores de una planta silvestre con sus cuatro pétalos y las anteras asomadas, amarillas por su polen maduro. **F.** Flores del mutante *pin1-201* con siete pétalos, su estigma amorfo y sin anteras. **G.** Inflorescencia desnuda tipo "alfiler" del mutante *pin1-201*

8A, B). Este mutante en su estado homocigoto presenta anomalías en el desarrollo de flores, hojas y del sistema vascular (Figura 8C-G). Las flores pueden tener un número anormal de pétalos, cinco o seis, un carpelo femenino doblado, ausencia de anteras y, en algunos casos más drásticos, la ausencia total de órganos florales (Figura 8F, G). Debido a las severas anomalías en la flor, este mutante se mantiene como heterocigoto. Por otro lado, el mutante *pin2-3* tiene la inserción en el

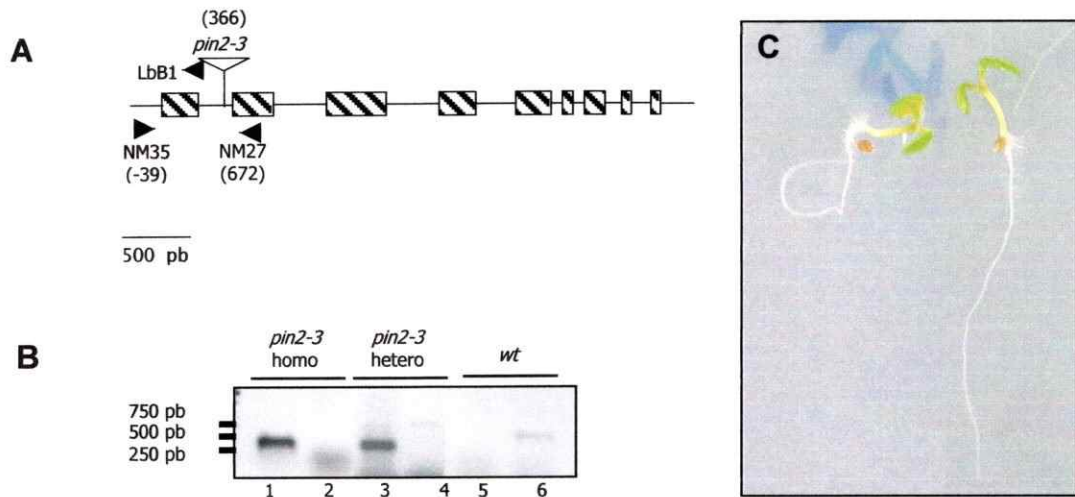


Figura 9. El mutante *pin2-3* tiene una raíz agravitrópica. **A.** Esquema de exones (☐) e intrones (líneas) del locus *pin2*, donde se muestra el sitio de inserción del T-DNA en el primer intrón y los partidores (▶) usados para comprobar la inserción en el locus. **B.** PCR usando gDNA de plantas *pin2-3* y de planta silvestre como templado y los partidores mostrados en **A**. En el gel, carriles 1, 3 y 5: LbB1-NM35; carriles 2, 4 y 6: NM35-27. **C.** Plantas de 4DPG crecidas verticalmente en medio MS sólido. El mutante *pin2-3* homocigoto es completamente agravitrópico en su raíz (planta de la izquierda), único tejido en el que se manifiestan fenotipos.

primer intrón del gen *Pin2* y es completamente agravitrópico en la raíz (Figura 9B), único tejido en el que se manifiesta algún fenotipo. La mutación *pin3-5* tiene una baja penetrancia, debido a que sus fenotipos son sólo parciales y difíciles de cuantificar (Friml y col., 2001a). Se midió el largo de la raíz de plantas de 4 DPG del mutante *pin3-5* y la planta silvestre, no encontrándose bajo las condiciones ensayadas diferencias significativas, aunque si se confirmó la inserción del T-DNA en el 5' UTR del locus *Pin3*.

La aparición de los fenotipos en los mutantes *pin1* y *pin2* descritos anteriormente se corresponde con deficiencias en el transporte polar de auxina en distintos tejidos y etapas del desarrollo de la planta debido a la ausencia de los transportadores de auxina. Si la función de la proteína PIN ausente puede ser repuesta por otros

componentes de la familia implicaría necesariamente cierta redundancia tanto en la funcionalidad misma de la proteína, el transporte de auxina, como en la localización en la membrana plasmática entre los componentes de la familia. Con el fin de evaluar esta hipótesis, cada uno de los mutantes insercionales fue cruzado con los constructos del intercambio de promotores que contienen el promotor que corresponde. Así el mutante *pin1-201* fue cruzado con las plantas wt 1:1, wt 1:2 y wt 1:3, el mutante *pin2-3* fue cruzado con las plantas wt 2:1, wt 2:2 y wt 2:3 y el mutante *pin3-5* fue cruzado con los mutantes wt 3:1, wt 3:2 y wt 3:3. Además como control para los subsecuentes experimentos, los tres mutantes fueron cruzados con la planta que fue transformada con el vector vacío pCAMBIA.GUS.E9. Todos los cruces fueron seguidos tanto por la doble resistencia (kanamicina para los mutantes e higromicina para las fusiones del *intercambio de promotores*) como por los marcadores moleculares diseñados para ambos transgenes. A la fecha se están seleccionando las plantas doble heterocigotas en la generación F1 por la doble resistencia a higromicina (constructos *intercambio de promotores*) y a kanamicina (mutación insercional).

La generación de cruces entre los mutantes *pin1-201*, *pin2-3* y *eir1-1* y la línea DR5rev:GFP permite evaluar la funcionalidad de los transportadores de auxina.

En el ápice de la raíz primaria se ha detectado un máximo de auxina que se correlaciona tanto con la mantención del meristema apical y con la respuesta gravitrópica (Sabatini y col., 1999). Este máximo de auxina se genera y mantiene gracias a la acción concertada de los *efflux carriers* que se expresan en la zona. Interesantemente, el único de los mutantes PIN que tiene deficiencias serias en la respuesta gravitrópica es *pin2*. Este mutante es agravitrópico debido a que la auxina

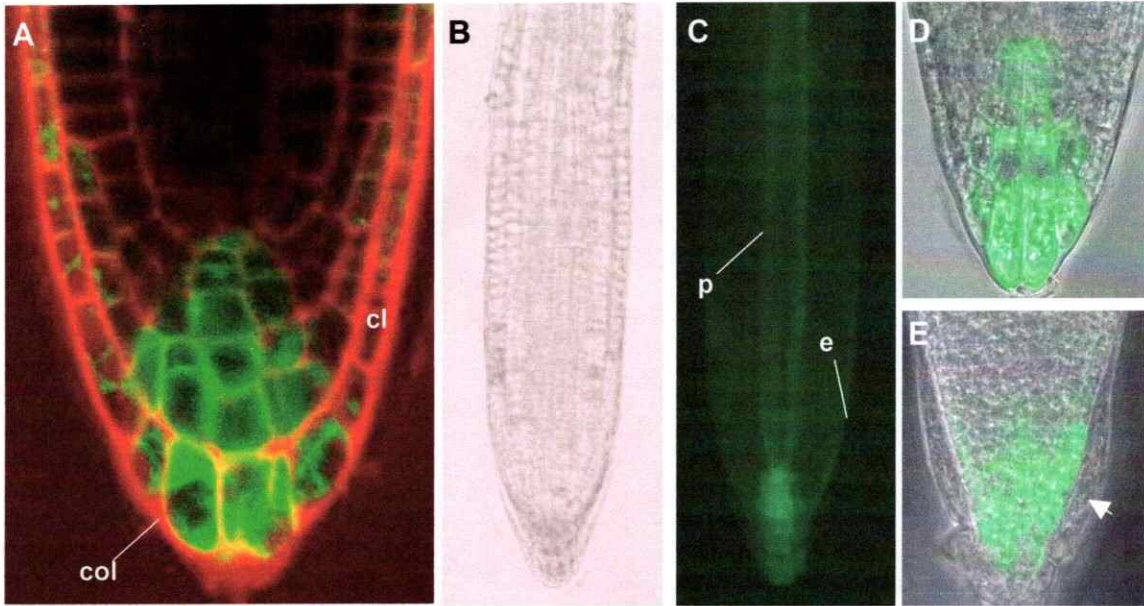


Figura 10. El marcador DR5rev:GFP permite evaluar la funcionalidad de los constructos del intercambio de promotores. Patrones de expresión de DR5rev:GFP en plántulas de 4 DPG. En la planta silvestre, la actividad DR5rev:GFP se acumula principalmente en las células de la columella (**col**), con algo de actividad en el cap lateral (**cl**) (**A, D**). Además se ve algo de acumulación a lo largo de la epidermis (**e**) y el periciclo (**p**) (**C**). Los niveles de GFP están alterados en el mutante *eir1-1* DR5rev:GFP (**E**), presentando una acumulación anormal en el cap lateral además de las células de la columella (indicado con una flecha). Imágenes de fluorescencia en microscopía confocal (**A, D, E**) y epifluorescencia (**C**). Imagen de microscopía DIC en **B** y de contraste de fase en **D** y **E**. En **A** se muestra la contraindicación con yoduro de propidio en rojo, que marca pared celular y permite delimitar las células. En verde la acumulación de proteína la GFP.

que se moviliza por la vasculatura y que llega a las células de la columella se acumula anormalmente debido a la ausencia total de un *efflux carrier* que la drene (Ottenschlager y *col.*, 2002). Por lo tanto, la acumulación anormal de auxina en el ápice es otro fenotipo característico de los mutantes en la proteína PIN2. El marcador de los gradientes de auxina DR5rev:GFP es una manera indirecta de visualizar la actividad de los constructos sobre el transporte y acumulación de auxina. Esta línea contiene la proteína fluorescente verde GFP con señales de destinación y retención en retículo, bajo el control del promotor artificial de respuesta a auxina DR5rev (Tabla II, Ottenschlager y *col.*, 2002). En la planta *wt* DR5rev:GFP, se logra visualizar claramente en el cap de la raíz una gran acumulación de GFP (Figura 10A), que marca

precisamente este lugar de alta acumulación y actividad de auxina. Se realizó el cruce entre esta planta y el mutante puntual en la proteína PIN2, *eir1-1*, obteniéndose doble homocigotas, para la inserción del marcador DR5rev:GFP y para la mutación en *Pin2*. Observamos que la expresión y acumulación del reportero fluorescente en el ápice de la raíz se extiende de forma anormal por toda la columella y el cap en la planta *eir1-1*DR5rev:GFP (Figura 10E). En los cruces, la restauración del patrón de fluorescencia en el mutante *eir1-1* DR5rev:GFP será una manera indirecta de ver la localización y funcionalidad de las proteínas en los constructos del intercambio de promotores. Este marcador se introdujo mediante cruces tanto en los mutantes insercionales *pin1-201*, *pin2-3* y *pin3-5* y/o en las plantas transgénicas con los constructos del *intercambio de promotores* y seguidas por la segregación de la resistencia a sulfadiazina. Las líneas *pin1-201* DR5revGFP, *pin2-3* DR5revGFP y *pin3-5* DR5revGFP al momento del escrito se encuentran en la generación F2, seleccionándose las dobles homocigotas.

Diseño y caracterización de anticuerpos policlonales contra las proteínas PIN1, PIN2 y PIN3.

Con el fin de determinar la localización subcelular de los PIN en los diferentes tejidos, se hicieron anticuerpos policlonales contra un péptido de la región hidrofílica de PIN1, PIN2 y PIN3 y con ellos se estandarizó la técnica de inmunolocalización en planta completa descrita por Friml y col., 2003b. Los anticuerpos policlonales generados en la presente tesis fueron hechos en conejo contra un péptido diseñado en la zona hidrofílica de PIN1, PIN2 y PIN3 (Figura 1). Este péptido corresponde a una secuencia lineal de 14-16 aminoácidos que cumplen ciertos parámetros enmarcados dentro del algoritmo descrito por Kolaskar y Tongaonkar (1990) que permite escoger zonas de alta antigenicidad. Cada péptido fue inyectado en dos conejos, de los cuales se

sacaron 5 sangrías, donde sólo la tercera y la quinta tienen aplicabilidad. Todas las sangrías fueron sometidas al test de ELISA y mostraron que el péptido puede unir el péptido respectivo (ensayos hechos en Bioschile). La quinta sangría de los antiPIN1 y antiPIN2 se sometió a purificación con una columna de afinidad construida con los péptidos correspondientes. Las cinco eluciones que se hicieron a la columna de afinidad dieron concentraciones de entre 5-10 ng/ μ L de proteína. Con estos anticuerpos se procedieron a realizar ensayos con el fin de determinar la efectividad de la purificación (en términos de aumentar la especificidad del anticuerpo). Primero, se realizaron western blots contra proteína total y/o fracción microsomal de plantas completas y/u otros tejidos específicos (por ejemplo, raíz) tanto de plantas silvestres como de mutantes. Todo esto para determinar especificidad de los anticuerpos policlonales. El suero antiPIN2 (anticuerpo sin purificar) detecta una banda en los 69 kDa que corresponde al tamaño de la proteína PIN2, además de una banda inferior que corresponde a un frente de corrida de membranas de cloroplastos pues se puede distinguir el color verde en el gel de poliacrilamida (Figura 11E, banda inferior). Este suero se purificó por afinidad contra el péptido y se hizo una inmunolocalización en plántulas de 4 DPG. El antiPIN2 purificado detecta claramente una señal apical en las células de la corteza y epidermis (Figura 11A-C) de la raíz que desaparece en el mutante nulo *pin2-3* (Figura 11D) demostrando tanto la especificidad del anticuerpo como la efectividad de la técnica para detectar epítopes intracelulares en la raíz primaria.

El suero antiPIN1 reconoce una proteína del tamaño esperado en un extracto de proteína total de plantas silvestres (66 kDa, Figura 12A). No obstante, la especificidad no fue probada debido a que no se hicieron los ensayos en paralelo con proteínas

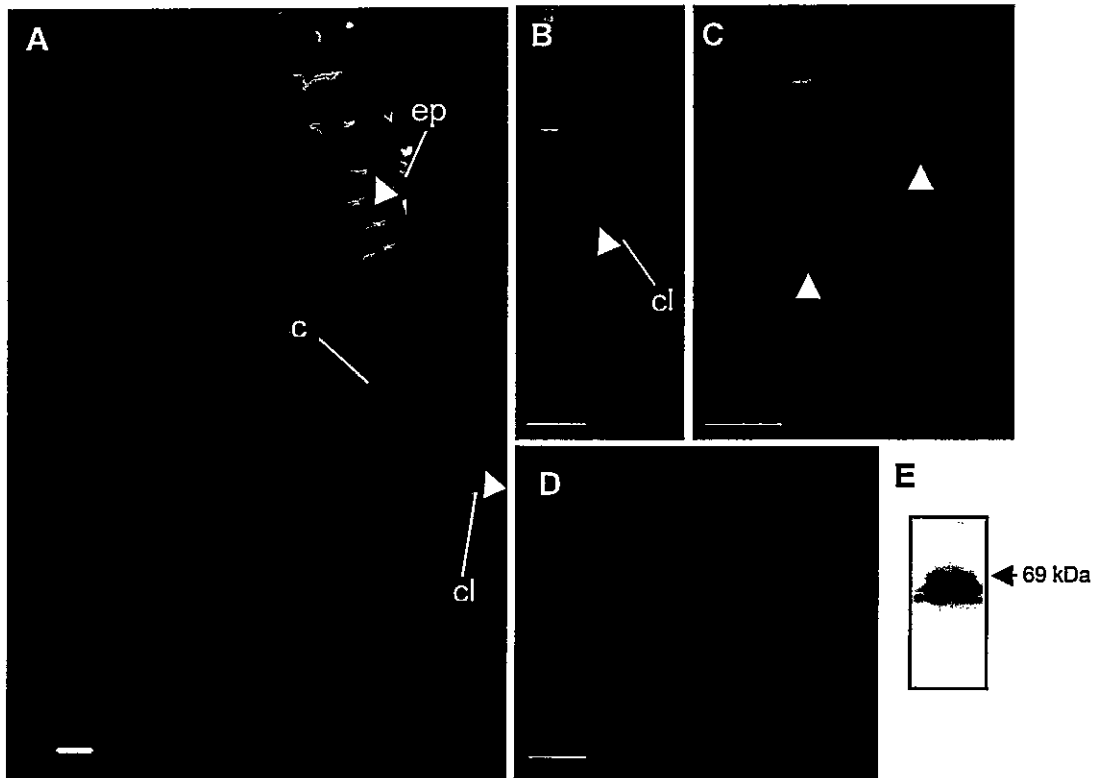


Figura 11. La proteína PIN2 se localiza apicalmente en la corteza y epidermis de la raíz primaria. Plantas de 4 DPG fueron impermeabilizadas e incubadas con el antiPIN2 purificado con afinidad diluido 1/40 (Materiales y Métodos 4.6). **A.** Se observan señales en la membrana de las dos capas externas, corteza (c) y epidermis (ep) y en algunas células del cap lateral (cl). **B.** En el cap lateral aparecen marcas que parecen una sornisa invertida (flecha) por lo que presumimos que la señal es apical. **C.** En las células de la epidermis y la corteza aparece una señal presumiblemente apical en toda la fila de células. **D.** En el mutante nulo *pin2-3* no aparecen marcas en la inmunolocalización. **E.** Western blot contra fracción microsomal de plantas silvestres usando el suero inmune antiPIN2. Una señal cercana a los 69 kDa (flecha), que corresponde al tamaño de PIN2, aparece sobre del frente de corrida que se extiende por toda la membrana. Anticuerpo primario diluido 1/1000, secundario antiIgG de conejo dilución 1/5000. Barras: A, D: 20 μ m; B: 7 μ m; C: 10 μ m.

extraídas de alguno de los mutantes nulos homocigotos, *pin1-1 ttg1* o *pin1-201*, debido principalmente a que el mutante se propaga como heterocigoto y fue difícil reunir suficiente tejido del mutante homocigoto. De todas maneras este anticuerpo se purificó por afinidad contra el péptido y se usó en ensayos de inmunolocalización en planta completa (Figura 12B, C). En este ensayo se detectó una señal basal en las células de la vasculatura (Figura 12B) y una apical en la epidermis (Figura 12C), que concuerda con lo publicado recientemente. Sin embargo, quedan algunos análisis por realizar

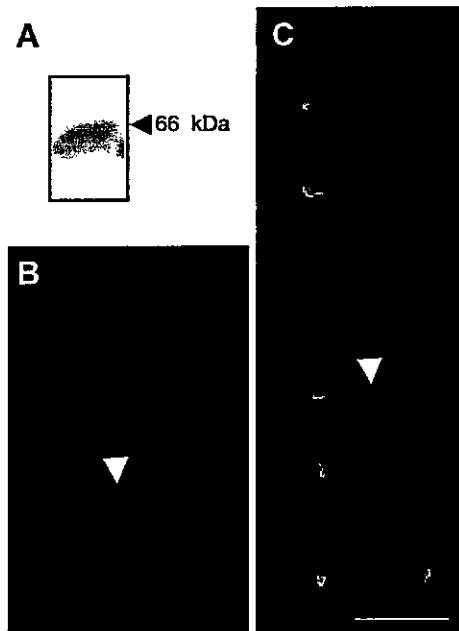


Figura 12. El anticuerpo antiPIN1 purificado por afinidad reconoce una señal en la epidermis y la vasculatura. En un western blot usando proteína total de planta silvestre se detecta una banda cercana a los 66 kDa, que corresponde al tamaño de la proteína PIN1 (A). La inmunolocalización usando este anticuerpo detecta una señal basal en las células de la vasculatura en la raíz primaria (B) y apical en las células de la epidermis (C). En el western blot, suero antiPIN1 (anticuerpo sin purificar), dilución 1/100, secundario, dilución 1/5000. En la inmunolocalización, antiPIN1 dilución 1/100, secundario 1/500 antiIgG de conejo acoplado a Alexa488. Barras 10 μm .

para determinar la especificidad de la señal detectada en planta en la inmunolocalización como en los *western blot*. Estos ensayos van en el sentido de verificar que las señales que están siendo detectadas con el anticuerpo corresponden a la proteína PIN1, principalmente a través de la comparación respecto al mutante nulo *pin1-201*.

DISCUSIÓN.

El transporte polar de auxina está regulado a nivel celular por la localización polarizada en la membrana plasmática de los *efflux carrier* de la familia PIN. En el ápice de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, la expresión y localización subcelular de las proteínas PIN1, -2, -3, -4 y -7 pueden explicar por si solos la dirección neta del transporte de auxina. Sin embargo, el único de los mutantes que presenta un fenotipo drástico en la raíz es el mutante *pin2* (Figura 9C), indicando que la respuesta génica en el tejido puede suplir la función en el resto de los mutantes simples (e incluso en algunos dobles mutantes). De hecho, un par de estudios muestran que existe una expresión ectópica de los componentes no mutados en respuesta a la ausencia de uno o más de los componentes de la familia (Blilou y *col.*, 2005, Papanov y *col.*, 2005). La idea de la modulación de la respuesta génica frente a la pérdida de uno o más PINs se ve apoyada además por la evidencia de que algunos de los componentes de la familia se co-regulan por mecanismos que dependen de los niveles de auxina (Vieten y *col.*, 2005). Por lo tanto, la localización polarizada de las proteínas PIN siempre va a estar en el sentido que permita restaurar el transporte polar de auxina normal. Para ello es necesario que existan mecanismos celulares comunes para destinar polarizadamente y de forma dinámica *Complejos Transportadores de Auxina*, caracterizados por las proteínas PIN, y que son ensamblados en compartimentos intracelulares y destinados polarmente en vesículas, en un transporte que depende de actina.

En la raíz primaria de *A. thaliana*, las secuencias promotoras de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* tienen dominios de actividad que son parcialmente excluyentes y que permiten tener tres dominios de expresión en la raíz: *Pin1* se expresa en la vasculatura central, en

periciclo y endodermis (Galweiler y col., 1998); *Pin2* lo hace en las dos capas más externas, corteza y epidermis (Muller y col 1998); y *Pin3* se expresa en las células de la columella y del periciclo de toda la planta (Friml y col., 2002a). Sieberer y col., (2000) mostraron que la expresión del gen *pin2* es exclusiva de la epidermis y corteza de la región de diferenciación de la raíz, donde regula la respuesta gravitropica. Además se mostró que existen regiones río abajo del ATG que dan especificidad a la expresión del gen. La ausencia de estas regiones río abajo hacen que los dominios de expresión se extiendan además a la región de la vasculatura (Sieberer y col., 2000). Este hecho le da sentido a la actividad vista para la fusión pPIN2:GUS que contiene sólo la región río arriba. Sin embargo, en conjunto los promotores clonados en esta tesis muestran al menos dos dominios de expresión en la raíz: la columella (promotor *Pin3*) y la vasculatura (promotores *Pin1* y *Pin2*), aunque aún debe comprobarse que la actividad del promotor pPIN2 está reguñada por elementos presentes en la región transcrita.

La actividad de las proteínas PIN en la membrana plasmática genera gradientes y máximos de auxina que resultan cruciales para distintos procesos fisiológicos. En los primordios de las raíces laterales y de tallos este máximo de auxina coincide con el sitio de formación del nuevo órgano (Benková y col., 2003). En la raíz primaria, este máximo está relacionado con la mantención y formación del meristema apical y con la respuesta gravitropica. El máximo de auxina en la raíz se produce en las células de la columella, sitio donde se sensa y responde a cambios en el vector gravedad (Figura 10A). La redistribución asimétrica de auxina en la epidermis ante un cambio en el vector de gravedad genera la inhibición de la elongación en una cara de la raíz respecto a otra, que a la larga da como resultado que la raíz se doble en favor del nuevo vector gravedad. El agravitropismo del mutante *pin2* se debe a que la auxina no

se drena de la región de la columella hacia la epidermis y cap lateral, donde es necesario un transporte diferencial de un lado respecto al otro para generar la respuesta gravitrópica. En este mutante se genera una acumulación anormal de auxina en la raíz. Con el marcador DR5rev:GFP se puede visualizar éste máximo de auxina anormal en el mutante alelo de *pin2-3, eir1-1* (Figura 10E), por lo que sirve indirectamente como marcador de la actividad de las proteínas PIN y de su localización polarizada. En los cruces, ya sea en las plantas transgénicas con los constructos del intercambio de promotores o en los mutantes *pin*, se introdujo mediante cruces el marcador DR5rev:GFP, de modo que los cruces entre los mutantes y las transgénicas además tienen este marcador de los máximos de auxina.

Por otra parte, para las proteínas PIN se generaron anticuerpos policlonales con el fin de hacer inmunolocalizaciones y detectar las proteínas PIN en la membrana plasmática. El método de Koloaskar y Tongaonkar (1999) es un algoritmo desarrollado para predecir secuencias antigénicas de superficie. Este algoritmo usa datos experimentales de hidrofobicidad, accesibilidad y flexibilidad calculados para cada aminoácido, en conjunto con datos estadísticos de la frecuencia de ocurrencia en secuencias antigénicas pequeñas conocidas. Con estos datos, se generó un nuevo parámetro ("*Antigenic Propensity*") que se usa para detectar las secuencias antigénicas de superficie. Con este algoritmo se escogió un péptido localizado en la región hidrofílica de las proteínas que no tiene homología a nivel de secuencia con el resto de las proteínas PIN (Figura 1). Con estos péptidos se hicieron anticuerpos policlonales en conejo, los sueros fueron purificados contra el péptido en una columna de afinidad, con los cuales se hicieron las inmunolocalizaciones. El antiPIN2 reconoce una señal presumiblemente apical en las células de la epidermis y corteza que desaparecen en el

mutante nulo *pin2-3* (Figura 11). Ambas observaciones dan la certeza de que la señal que se observa corresponde a la proteína PIN2 demostrando tanto la especificidad del anticuerpo como la utilidad del método de inmunolocalización. Con este anticuerpo se pretende inmunolocalizar PIN2 expresado ectópicamente en las plantas *pin1-201.1:2*, *pin2-3.2:2* y *pin3-5.3:2*, y comparar la localización subcelular en los distintos tipos celulares que los constructos determinan. Por otro lado, los otros dos anticuerpos (antiPIN1 y antiPIN3) requieren de un análisis más acabado para determinar su especificidad.

En experimentos futuros, se pretende evaluar la localización de la proteína PIN2 que se acumula en la vasculatura (constructo 1:2) y en la columella (constructo 3:2) y compararlas con la ya vista en la epidermis y corteza (Figura 11). Además, la acumulación de auxina en el cap de los mutantes *pin2-3* DR5rev:GFP 2:1, *pin2-3* DR5rev:GFP 2:2, *pin2-3* DR5rev:GFP 2:3 darán luces de la funcionalidad de las proteínas PIN en drenar la acumulación de auxina que se genera en la columella, lo que se verá apoyado por la observación de la complementación del fenotipo agravitrópico visto en el mutante *pin2* (Figura 9), que junto con mostrar de que existen o no mecanismos comunes para la destinación polar de estas tres proteínas a la membrana plasmática revelarán indirectamente la localización polarizada de las proteínas en la membrana plasmática.

CONCLUSIONES.

- En la presente tesis se generaron las herramientas moleculares y se sentaron las bases para evaluar si existen factores célula-específicos que determinan la localización polarizada de las proteínas PIN a la membrana plasmática.
- Se determinaron los sitios de actividad de los promotores de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* en la raíz primaria de *A. thaliana*.
- Se generaron plantas transgénicas con las fusiones entre los promotores y los marcos de lectura de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* ("intercambio de promotores").
- Se generó el doble mutante *pin2-3* DR5rev:GFP y este se cruzó con las plantas transgénicas expresando las fusiones entre los promotores y los marcos de lectura de *Pin1*, *Pin2* y *Pin3* con el fin de evaluar su funcionalidad.
- Se generaron anticuerpos policlonales contra PIN1, PIN2 y PIN3 usando péptidos diseñados con un algoritmo que predice epítopes de superficie.
- Se detectó localizada polarmente a la proteína PIN2 en las células de la epidermis, corteza y cap lateral en la raíz primaria .

REFERENCIAS.

- Abas L., Benjamins R., Malenica N., Paciorek T., Winiewska J., Moulinier-Anzola J., Sieberer T., Friml J., Luschnig C. (2006) *Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism*. *Nature Cell Biol.* 8: 249-256.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jurgens G., Friml J. (2003) *Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation*. *Cell* 111: 591-602.
- Blakeslee J., Bandyopadhyay A., Peer W., Makam S., Murphy A. (2004) *Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses*. *Plant Physiol.* 134: 28-31.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Papanov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005) *The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots*. *Nature* 433: 39-44.
- Brown D., Erwin L. (2000) *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane RAFTs*. *J Biol. Chem.* 275: 17221-17224.
- Christensen S., Dagenais N., Chory J., Weigel D. (2000) *Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID*. *Cell* 100: 469-478.
- Clough S., Bent A. (1999) *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-749.
- Delbarre A., Muller P., Guern J., (1998) *Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not influx, of auxin in suspension-cultured tobacco cells*. *Plant Physiol.* 116: 833-844.
- Friml J., Wisniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002a) *Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis*. *Nature* 415, 806-809.
- Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg g., Scheres B., Jurgens G., Palme K. (2002b) *AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis*. *Cell* 108: 661-673.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jurgens G (2003a) *Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis*. *Nature* 426: 147-153.
- Friml J., Benková E., Mayer U., Palme K., Muster G. (2003b) *Automated whole mount localization techniques for plant seedlings*. *Plant J.* 34: 115-124.
- Friml J. (2003c) *Auxin transport- shaping the plant*. *Curr. Op. Plant Biol.* 6: 7-12.

Friml J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A., Tietz O., Benjamins R., Ouwerkerk P., Ljung K., Sandberg G., Hooykaas P., Palme K., Offringa R. (2004) *A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux*. *Science* 306: 862-865.

Furutani M., Vernoux T., Traas J., Kato T., Tasaka M., Aida M. (2004) *PIN-FORMED1 and PINOID regulates boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis*. *Development* 131: 5021-5030.

Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman A., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998) *Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue*. *Science* 282: 2226-2231.

Geisler M., Blakeslee J., Bouchard R., Lee O., Vincezetti V., Bandyopadhyay A., Titapiwatanakun B., Peer W., Bailly A., Richards E., Ejendal K., Smith A., Baroux C., Grossniklaus U., Muller A., Hrycyna C., Doodlers R., Murphy A., Martinoia E. (2005) *Cellular efflux of auxin is catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1*. *Plant J.* 44: 179-194.

Geldner N., Anders N., Wolters H., Kelcher J., Kornberger W., Muller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A., Jurgens G. (2003) *The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport and auxin-dependent plant growth*. *Cell* 112: 219-230.

Grebe M., Xu J., Moblus W., Ueda T., Nakano A., Geuza J., Rook M., Scheres B. (2003) *Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes*. *Curr. Biol.* 13: 1378-1387.

Kolaskar A., Tongaonkar P. (1990) *A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens*. *FEBS* 276: 172-174.

Lehman A., Black R., Ecker J. (1996) *HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the Arabidopsis hypocotyl*. *Cell* 85: 183-194.

Luschnig C., Gaxiola R., Grisafi P., Fink G. (1998) *EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana*. *Gene Dev.* 12: 2175-2187.

Lusching C. (2001) *Auxin transport: Why plant like to think big*. *Current Biology* 11: R831-R833.

Marchant A., Kargul J., May S.T., Muller P., Delbarre A., Perrot-Rechenmann C., Bennett M. (1999) *AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues*. *EMBO J.* 18: 2066-2073.

Muller A., Guan C., Galweiler L., Tanzler P., Huijser P., Marchant A., Parry A., Bennett M., Wisman E., and Palme K. (1998) *AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control*. *EMBO J.* 17: 6903-6911.

- Ottenschlager I., Wolff P., Wolverton C., Bhalerao C., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M., Palme K. (2002) *Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells*. PNAS 100: 2987–2991.
- Papanov I., Teale W., Trebar M., Bllou I., Palme K. (2005) *The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives*. Trends Plant Sci. 10: 1360-1385.
- Peer W., Bandyopadhyay A., Blakeslee J., Makamam S., Rujin C., Masson P., Murphy A. (2004) *Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport*. Plant Cell 16: 1898-1911.
- Reinhardt D., Pesce E., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. (2003) *Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport*. Nature 423: 255-260.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoile T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., Scheres B. (1999) *An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root*. Cell 99: 463-472.
- Sambrook J., Manniatis T., Fritsch E.F. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Manniatis T and Sambrook Editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press Edit Second Edition. New York.
- Sieberer T., Seifert G., Hauser M., Grisaf P. Fink G., Luschnig C. (2000) *Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1*. Curr. Biol. 10:1595–1598.
- Steinmann T., Geldner N., Grebe M., Mangold S., Jackson C., Paris S., Galweiler L., Palme K., Jurgens G. (1999) *Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF-GEF*. Science 286: 316-318.
- Vieten A., Vanneste S., Wisnieska J., Benková E., Benjamins R., Beckman T., Lusching C., Friml J. (2005) *Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression*. Development 132: 4521-453
- Willemsen V., Friml J., Grebe M., van den Toom A., Palme K., Scheres B. (2003) *Cell polarity and PIN protein positioning in arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function*. Plant Cell 15: 612-625
- Zhou C., Yang Y., Joung A. (1990) *Mini-prep In Ten Minutes*. BioTechniques 8: 172-173.
- Zegzouti H., Anthony R., Jahchan N., Bögre L., Christensen S. (2006) *Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositidedependent protein kinase 1 (PDK1) in Arabidopsis*. PNAS 103: 6404–6409.

ANEXO 1.

Tabla V. Listado de los vectores construidos en la presente tesis.

Nombre	Vector de Origen	Inserto	Características
<i>pGEM-T pPIN1^S</i>	pGEM-T	Promotor de <i>Pin1</i>	Promotor de <i>Pin1</i> , corresponden a 1929 pb río arriba del gen <i>Pin1</i> . Permite hacer fusiones con las proteínas PIN1, 2, 3 y GUS usando los sitios de corte para enzimas de restricción <i>SalI</i> , <i>NcoI</i> y <i>PstI</i> introducidos en los partidores (Más detalles en Materiales y Métodos)
<i>pGEM-T pPIN2^S</i>	pGEM-T	Promotor de <i>Pin2</i>	Promotor de <i>Pin2</i> , corresponden a 1399 pb río arriba del gen <i>Pin2</i> . Permite hacer fusiones con las proteínas PIN1, 2, 3 y GUS usando los sitios de corte para enzimas de restricción <i>SalI</i> , <i>NcoI</i> y <i>PstI</i> introducidos en los partidores (Más detalles en Materiales y Métodos)
<i>pGEM-T pPIN3^S</i>	pGEM-T	Promotor de <i>Pin3</i>	Promotor de <i>Pin3</i> , corresponden a 1764 pb río arriba del gen <i>Pin3</i> . Permite hacer fusiones con las proteínas PIN1, 2, 3 y GUS usando los sitios de corte para enzimas de restricción <i>SalI</i> , <i>NcoI</i> y <i>PstI</i> introducidos en los partidores (Más detalles en Materiales y Métodos)
<i>pGEM-T pPIN4^S</i>	pGEM-T	Promotor de <i>Pin4</i>	Promotor de <i>Pin4</i> , corresponden a 1764 pb río arriba del gen <i>Pin4</i> . Permite hacer fusiones con las proteínas PIN1, 2, 3 y GUS usando los sitios de corte para enzimas de restricción <i>SalI</i> , <i>NcoI</i> y <i>PstI</i> introducidos en los partidores (Más detalles en Materiales y Métodos)
<i>pSL3-pPIN1^S</i>	pSL3	Promotor de <i>Pin1</i>	El promotor de <i>Pin1</i> proveniente del vector pGEM-T.pPIN1 fue movilizado con los sitios de corte de enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>SalI</i> dentro de los mismos sitios del vector pSL3. Aquí quedan en fusión traduccional con el gen reportero GUS y el terminador E9.
<i>pSL3-pPIN2^S</i>	pSL3	Promotor de <i>Pin2</i>	El promotor de <i>Pin2</i> proveniente del vector pGEM-T.pPIN2 fue movilizado con los sitios de corte de enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>SalI</i> dentro de los mismos sitios del vector pSL3. Aquí quedan en fusión traduccional con el gen reportero uidA (GUS) y el terminador E9.
<i>pSL3-pPIN3^S</i>	pSL3	Promotor de <i>Pin3</i>	El promotor de <i>Pin3</i> proveniente del vector pGEM-T.pPIN3 fue movilizado con los sitios de corte de enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>SalI</i> dentro de los mismos sitios del vector pSL3. Aquí quedan en fusión traduccional con el gen reportero uidA (GUS) y el terminador E9.
<i>pSL3-pPIN4^S</i>	pSL3	Promotor de <i>Pin3</i>	El promotor de <i>Pin4</i> proveniente del vector pGEM-T.pPIN4 fue movilizado con los sitios de corte de enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>SalI</i> dentro de los mismos sitios del vector pSL3. Aquí quedan en fusión traduccional con el gen reportero uidA (GUS) y el terminador E9.
<i>pBI-pPIN1^S</i>	pBI101.3	Fusión pPIN1:GUS:E9	La construcción pPIN1:GUS:E9 proveniente del vector pSL3.pPIN1 fue movilizada con los sitios de corte para <i>SalI</i> (5' promotor) y <i>EcoRI</i> (río abajo del terminador E9) en los mismos sitios dentro del T-DNA del vector binario pBI101.3.
<i>pBI-pPIN2^S</i>	pBI101.3	Fusión pPIN2:GUS:E9	La construcción pPIN2:GUS:E9 proveniente del vector pSL3.pPIN2 fue movilizada con los sitios de corte para <i>SalI</i> (5' promotor) y <i>EcoRI</i> (río abajo del terminador E9) en los mismos sitios dentro del T-DNA del vector binario pBI101.3.
<i>pBI-pPIN3^S</i>	pBI101.3	Fusión pPIN3:GUS:E9	La construcción pPIN3:GUS:E9 proveniente del vector pSL3.pPIN3 fue movilizada con los sitios de corte para <i>SalI</i> (5' promotor) y <i>EcoRI</i> (río abajo del terminador E9) en los mismos sitios dentro del T-DNA del vector binario pBI101.3.
<i>pBI-pPIN4^S</i>	pBI101.3	Fusión pPIN4:GUS:E9	La construcción pPIN4:GUS:E9 proveniente del vector pSL3.pPIN4 fue movilizada con los sitios de corte para <i>SalI</i> (5' promotor) y <i>EcoRI</i> (río abajo del terminador E9) en los mismos sitios dentro del T-DNA del vector binario pBI101.3.
<i>pGEM-T oPIN1^S</i>	pGEM-T	ORF de <i>Pin1</i>	Marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i> , ORF) de <i>Pin1</i> , 1869 pb, clonado a partir de la amplificación por PCR del clon U12338 (ver tabla I). En los partidores se introdujeron los sitios de corte para <i>BamHI</i> (3') y <i>PstI</i> (5') que permiten los posteriores pasos de clonación (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pGEM-T oPIN2^S</i>	pGEM-T	ORF de <i>Pin2</i>	Marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i> , ORF) de <i>Pin2</i> , 1944 pb, clonado a partir de la amplificación por PCR del clon U21751 (ver tabla I). En los partidores se introdujeron los sitios de corte para <i>BamHI</i> (3') y <i>PstI</i> (5') que permiten los posteriores pasos de clonación (Más detalles en Materiales y Métodos).

Nombre	Vector de Origen	Inserto	Características
<i>pGEM-T oPIN3</i> ^S	pGEM-T	ORF de <i>Pin3</i>	Marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i> , ORF) de <i>Pin3</i> , 1923 pb, clonado a partir de la amplificación por PCR del clon RAFL07-12-J09 (ver tabla 1). En los plásmidos se introdujeron los sitios de corte para <i>Bam</i> HI (3') y <i>Pst</i> I (5') que permiten los posteriores pasos de clonación (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pGEM-T.1:1</i> ^S	pGEM-T.oPIN1	Fusión del promotor de <i>Pin1</i> y el ORF de <i>Pin1</i>	En el vector pGEM-T.oPIN1 se insertó el promotor de <i>Pin1</i> río arriba del ORF <i>Pin1</i> usando los sitios de corte <i>Sall</i> y <i>Pst</i> I (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pGEM-T.1:2</i> ^S	pGEM-T.1:1	Fusión del promotor de <i>Pin1</i> y el ORF de <i>Pin2</i>	En el vector pGEM-T.1:1 se insertó el ORF de <i>Pin2</i> río abajo del promotor <i>Pin1</i> usando los sitios de corte <i>Sall</i> y <i>Pst</i> I (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pGEM-T.3:1</i> ^S	pGEM-T.oPIN1	Fusión del promotor de <i>Pin3</i> y el ORF de <i>Pin1</i>	En el vector pGEM-T.oPIN1 se insertó el promotor de <i>Pin3</i> río arriba del ORF <i>Pin1</i> usando los sitios de corte <i>Sall</i> y <i>Pst</i> I (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pGEM-T.3:2</i> ^S	pGEM-T.3:1	Fusión del promotor de <i>Pin3</i> y el ORF de <i>Pin2</i>	En el vector pGEM-T.3:1 se insertó el ORF de <i>Pin2</i> río abajo del promotor <i>Pin3</i> usando los sitios de corte <i>Bam</i> HI y <i>Pst</i> I (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.1:1</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	Fusión del promotor de <i>Pin1</i> y el ORF de <i>Pin1</i>	La fusión pPIN1:oPIN1 proveniente de pGEM-T.1:1 se movilizó dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 usando los sitios de corte <i>Sall</i> y <i>Bam</i> HI (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.1:2</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	Fusión del promotor de <i>Pin1</i> y el ORF de <i>Pin2</i>	La fusión pPIN1:oPIN2 proveniente de pGEM-T.1:2 se movilizó dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 usando los sitios de corte <i>Sall</i> y <i>Bam</i> HI (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.1:3</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN1 y oPIN3	Triple ligación entre pPIN1, oPIN3 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN1:oPIN3:E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.2:1</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN2 y oPIN1	Triple ligación entre pPIN2, oPIN1 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN2:oPIN1:E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.2:2</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN2 y oPIN2	Triple ligación entre pPIN2, oPIN2 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN2:oPIN2:E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.2:3</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN2 y oPIN3	Triple ligación entre pPIN2, oPIN3 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN2:oPIN3:E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.3:1</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	Fusión del promotor de <i>Pin3</i> y el ORF de <i>Pin1</i>	La fusión pPIN3:oPIN1 proveniente de pGEM-T.3:1 se movilizó dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 usando los sitios de corte <i>Sall</i> y <i>Bam</i> HI (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.3:2</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	Fusión del promotor de <i>Pin3</i> y el ORF de <i>Pin2</i>	La fusión pPIN3:oPIN2 proveniente de pGEM-T.3:2 se movilizó dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 usando los sitios de corte <i>Sall</i> y <i>Bam</i> HI (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.3:3</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN3 y oPIN3	Triple ligación entre pPIN3, oPIN3 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN3:oPIN3:E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.4:1</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN4 y oPIN1	Triple ligación entre pPIN4, oPIN1 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN4:oPIN1:E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.4:2</i> ^S	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN4 y oPIN2	Triple ligación entre pPIN4, oPIN2 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN4:oPIN2:E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).

Nombre	Vector de Origen	Inserto	Características
<i>pCAMBIA.4:3</i> [§]	pCAMBIA.GUS.E9	pPIN4 y oPIN3	Triple ligación entre pPIN4, oPIN3 y el vector pCAMBIA.GUS.E9, generándose las fusiones pPIN1:oPIN3.E9 dentro del T-DNA del vector binario pCAMBIA.GUS.E9 vector binario (Más detalles en Materiales y Métodos).
<i>pCAMBIA.GUS.E9</i> [§]	pCAMBIA1300	GUS.E9	Fragmento GUS.E9 proveniente del vector pSL3 insertado entre los sitios de corte Sall y EcoRI del vector pCAMBIA1300. Este vector queda con un sitio de múltiple clonamiento río arriba de GUS y es ideal para probar la actividad de promotores. (esquema en figura 6A)
<i>pET22b-PIN1p</i> [‡]	pET22b	Péptido codificante de la región hidrofílica de PIN1. **	Corresponden a los nucleótidos +462 al +1224 del ORF de pin1 clonados en el vector de expresión bacteriano pET22b donde quedan en fusión carboxiterminal con una cola de histidinas.
<i>pET22b-PIN2p</i> [‡]	pET22b	Péptido codificante de la región hidrofílica de PIN2. **	Corresponden a los nucleótidos +822 al +1460 del ORF de pin2 clonados en el vector de expresión bacteriano pET22b donde quedan en fusión carboxiterminal con una cola de histidinas.
<i>pET22b-PIN3p</i> [‡]	pET22b	Péptido codificante de la región hidrofílica de PIN3. **	Corresponden a los nucleótidos +999 al +1449 del ORF de pin3 clonados en el vector de expresión bacteriano pET22b donde quedan en fusión carboxiterminal con una cola de histidinas.
<i>pET30c-oPIN1</i> [#]	pET30c	ORF de pin1 proveniente del vector U12338	Este vector tiene clonado el ORF de pin1 bajo el control de un promotor inducible por IPTG en el vector bacteriano pET30c. Permite expresar en bacteria (<i>E coli</i> BL21) la proteína PIN1 en fusión con una cola de histidinas.
<i>pET30c-oPIN2</i> [#]	pET30c	ORF de pin2 proveniente del vector U21751	Este vector tiene clonado el ORF de pin2 bajo el control de un promotor inducible por IPTG en el vector bacteriano pET30c. Permite expresar en bacteria (<i>E coli</i> BL21) la proteína PIN2 en fusión con una cola de histidinas.

[§] Enmarcados en la estrategia experimental del *intercambio de promotores*.

[‡] Diseñados con el fin de expresar una región de la proteína para hacer anticuerpos policlonales contra las proteínas PIN.

** Regiones codificantes según literatura.

[#] Construidos con el fin de probar la reacción cruzada entre los anticuerpos antiPIN1 y antiPIN2.

ANEXO 2.

Tabla VI. Listado de partidores diseñados. Se incluyen los partidores usados para clonar los promotores (1), ORFs (2) y las regiones hidrofílicas (3) de PIN1, 2, 3 y 4. Además se listan aquellos partidores diseñados para genotipar y comprobar la inserción de los mutantes *pin1-201* (4), *pin2-3* (5) y otros mutantes insercionales (6), y los marcadores moleculares del intercambio de promotores (7). Junto con estos partidores, están los que fueron diseñados y sintetizados, pero cuyo uso se postergó por diversas razones.

Partidor	Secuencia	O ^a	Uso	Descripción
NM1	<u>CATATgCgTggAgCTAAgCCTTTTgAT</u>	D	(3)	Junto a NM2 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN1. Sitio NdeI subrayado.
NM2	<u>gTCgACAgAgATCTTAACgTCCTTTTg</u>	I	(3)	Junto a NM1 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN1. Sitio SalI subrayado.
NM3	<u>CATATgCCAAgCCCTGgTCACggTTA</u>	D	(3)	Junto a NM4 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN2. Sitio NdeI subrayado.
NM4	<u>CTCgAgATTAgTCTGgTCATCACACTCg</u>	I	(3)	Junto a NM3 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN2. Sitio XhoI subrayado.
NM5	<u>CATATgTTAATACgAATCgACgAgAC</u>	D	(3) (7)	Junto a NM6 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN3. Sitio NdeI subrayado. Además este par de partidores flanquean un intrón, por lo que fue usado como marcador molecular del intercambio de promotores
NM6	<u>CTCgAgTATACgCCTTgTCATCACAC</u>	I	(3) (7)	Junto a NM5 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN3. Sitio XhoI subrayado. Además este par de partidores flanquean un intrón, por lo que fue usado como marcador molecular del intercambio de promotores
NM7	<u>CATATgTTCTAACTTAACCATTCTgA</u>	D	(3)	Junto a NM8 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN4. Sitio NdeI subrayado.
NM8	<u>CTCgAgACCACCTTAGCATTACTCTTC</u>	I	(3)	Junto a NM7 amplifican la región codificante del dominio hidrofílico de PIN4. Sitio XhoI subrayado.
NM9	<u>gTCgACCgTTTCAAgTATTgCTAAA-AggTC</u>	D	(1)	Junto a NM10 amplifican 1929 pb de la región promotora de <i>Pin1</i> . Sitio SalI (subrayado)

Partidor	Secuencia	O*	Uso	Descripción
NM10	<u>C</u> TgCagACCCGAIggCTTTTgTTCgCCgAgAagAg	I	(1)	Junto a NM9 amplifican 1929 pb de la región promotora de <i>Pin1</i> . Sitios PstI (<i>ítilica</i>) y NcoI (<u>subrayado</u>) unidos por dos bases AC para dejar en marco el ATG del sitio NcoI (<i>negritas</i>) y del gen fusionado al sitio PstI.
NM11	gICgACTAgTTTCATCCTgTTTTATCAgg	D	(1)	Junto a NM12 amplifican 1399pb de la región promotora de <i>Pin2</i> . Sitio Sall <u>subrayado</u>
NM12	CTgCagACCCGAIggTTTgATTACCTTTTCCgCgAg	I	(1)	Junto a NM11 amplifican 1399 pb de la región promotora de <i>Pin2</i> . Sitios PstI (<i>ítilica</i>) y NcoI (<u>subrayado</u>) unidos por dos bases, AC, para dejar en marco el ATG de NdeI y del gen fusionado en el sitio PstI
NM13	ICCGgAAATgATTACgCgCgGAC	D	(2)	Junto a NM15 o NM16 amplifican los 1869 pb correspondientes al ORF de <i>Pin1</i> . ATG de inicio del gen <i>Pin1</i> en <i>negritas</i> . Sitio PstI <u>subrayado</u>
NM14	CIgCagATgATTACgCgCgGAC	D	(2)	Junto a NM15 o NM16 amplifican los 1869 pb correspondientes al ORF de <i>Pin1</i> . ATG de inicio del gen <i>Pin1</i> . Sitio BspEI <u>subrayado</u>
NM15	ggATCCCTCATgACCCCAgAgAAATgTAG	I	(2) (7)	Junto a NM13 o NM14 amplifican los 1869 pb correspondientes al ORF de <i>Pin1</i> . Codón stop en <i>negritas</i> . Sitio BamHI <u>subrayado</u> . Además este partidor junto a NM14 flanquean los dos últimos intrones del locus <i>Pin1</i> por lo que fue usado como marcador molecular del intercambio de promotores
NM16	ggATCCCATAgACCCCAgAgAAATgTAG	I	(2)	Junto a NM13 o NM14 amplifican los 1869 pb correspondientes al ORF de <i>Pin1</i> . Codón stop en <i>negritas</i> fue eliminado para permitir la fusión de genes en el carboxilo-terminal. Sitio BamHI <u>subrayado</u>
NM17	ICCGgAAATgATCACCGgCAAAGACATgTA	D	(2)	Junto a NM19 o NM20 amplifican los 1944 pb correspondientes al ORF de <i>Pin2</i> . ATG de inicio del gen <i>Pin2</i> en <i>negritas</i> . Sitio PstI <u>subrayado</u>
NM18	CTgCagATgATCACCGgCAAAGACATgTA	D	(2)	Junto a NM19 o NM20 amplifican los 1944 pb correspondientes al ORF de <i>Pin2</i> . ATG de inicio del gen <i>Pin2</i> . Sitio BspEI <u>subrayado</u> .
NM19	ggATCCCTTAAgCCCCCAAAgAACgTAG	I	(2)	Junto a NM19 o NM20 amplifican los 1944 pb correspondientes al ORF de <i>Pin2</i> . Codón stop en <i>negritas</i> . Sitio BamHI <u>subrayado</u>
NM20	ggATCCCTTAAgCCCCCAAAgAACgTAG	I	(2)	Junto a NM19 o NM20 amplifican los 1944 pb correspondientes al ORF de <i>Pin2</i> . Codón stop en <i>negritas</i> fue eliminado para permitir la fusión traduccional en el carboxilo terminal. Sitio BamHI <u>subrayado</u>
NM21	CTgCagACCCGAIggCTTgAagggACAAAAATggAAAAAC	I	(1)	Junto a NM22 amplifican 1764 pb de la región promotora de <i>Pin3</i> . Sitios PstI (<i>ítilica</i>) y NdeI (<u>subrayado</u>) unidos por dos bases, AC, para dejar en marco el ATG de NdeI y del gen fusionado en el sitio PstI

Partidor	Secuencia	C ^a	Uso	Descripción
NM22	<u>gTCgACAgCAACACTAAgTCACAgaAag</u>	D	(1)	Junto a NM21 amplifican 1764 pb de la región promotora de <i>Pin3</i> . Sitio <i>Sall</i> subrayado.
NM23	<u>CTgCagATgATCTCATggCACgACC</u>	D	(2)	Junto a NM24 amplifican el ORF completo de <i>Pin3</i> , 1923 pb. ATG de inicio del gen <i>Pin3</i> en negritas. Sitio <i>PstI</i> subrayado
NM24	<u>ggATCCTTATAACCCgAgTAGAAg</u>	I	(2)	Junto a NM24 amplifican el ORF de <i>Pin3</i> , 1923 pb. Codón stop en negritas. Sitio <i>BamHI</i> subrayado
NM25	<u>CTgCagACCCAIgTTTTCCggTgggTTTTggAg</u>	I	(1)	Junto a NM26 amplifican 1764 pb de la región promotora de <i>Pin4</i> . Sitios <i>PstI</i> (<i>hílica</i>) y <i>NdeI</i> (<u>subrayado</u>) unidos por dos bases para dejar en marco el ATG de <i>NdeI</i> y del gen fusionado en el sitio <i>PstI</i> .
NM26	<u>gTCgACCACCTACTTCTTTATTCTTTCC</u>	D	(1)	Junto a NM25 amplifican 1764 pb de la región promotora de <i>Pin4</i> . Sitio <i>Sall</i> subrayado
NM27	<u>ATgAACAAACCCTTTAAACACATCC</u>	I	(4)	Junto a <i>LbB1</i> amplifica fragmento de 650 pb en el mutante <i>pin1-2</i>
NM28	<u>gAACCAgAgTATTgCCATAC</u>	I	(6)	Junto a <i>LbB1</i> amplifica fragmento de 500 pb en <i>pin3-5</i>
NM29	<u>ACCAAACTTgCTCACTCCACAC</u>	D	(6)	Junto a NM28 amplifica secuencia de 510 pb en locus de <i>Pin3</i> , en el lugar de la inserción <i>pin3-5</i> .
NM30	<u>TgATgTggTCTgTgCagSTgg</u>	D	(4)	Amplifica junto a NM27 una secuencia de 700 pb del locus <i>Pin1</i> en la región donde se encuentra la inserción del T-DNA del mutante <i>pin1-2</i> .
NM31	<u>gTCgTCACCTATCTgCATCg</u>	I	(6)	Para polimorfismo <i>pin3-4</i> . Amplifica junto a partidor NM23 secuencia de 600 pb en el primer exón de <i>Pin3</i>
NM32	<u>CCTAACTCACCCgCgACgTCT</u>	I	(7)	Amplifica junto a NM33 439 pb del gen <i>hptII</i> del vector pCAMBIA1300
NM33	<u>TCACgCCATgTAGTgTATTgAC</u>	D	(7)	Amplifica junto a NM32 439 pb del gen <i>hptII</i> del vector pCAMBIA1300
NM34	<u>CTTCCCTCTCTCTCTCCggCg</u>	D	(7)	Hibrida en la secuencia 5'UTR de <i>Pin1</i> . Junto a los partidores NM37, NM38 o NM39 amplifican una secuencia de 500 pb aprox
NM35	<u>TCTTCTCTCTCTCTCTCTgC</u>	D	(7)	Hibrida en la secuencia 5'UTR de <i>Pin2</i> . Junto a los partidores NM37, NM38 o NM39 amplifican una secuencia de 500 pb aprox
NM36	<u>TTTTCCATTTTTgTCCCCTTCAAag</u>	D	(7)	Hibrida en la secuencia 5' UTR de <i>Pin3</i> . Junto a los partidores NM37, NM38 o NM39 amplifican una secuencia de 500 pb aprox

Partidor	Secuencia	O*	Uso	Descripción
NM37	ATCAAAAgCTTAgtCTCCACg	I	(7)	Idéntico a NM1, pero inverso. Junto al partidor del promotor (NM34, NM35 o NM36) amplifica secuencias de aprox. 500 pb en los constructos del intercambio de promotores
NM38	TgCTCTgAAgCACCACgATCTgC	I	(7)	Junto al partidor del promotor (NM34, NM35 o NM36) amplifica secuencias de aprox. 450 pb en los constructos del intercambio de promotores
NM40	ggTTgTTCATggCgTTAAACC	D	(7)	Junto a NM15 amplifica una secuencia de 550 pb desde el locus <i>Pir1</i> o de 330 pb desde el ORF de <i>Pir1</i> .
NM41	ATgTTCgTgTggAgTTCgAgTgC	D	(6)	Marcador molecular mutante <i>pir2-1</i> . Junto a NM4 flanquean el sitio de la inserción.
NM42	TAACCgTgACgAgggCTTgg	I	(6)	Marcador molecular de <i>pir2-2</i> , idéntico a NM3, pero inverso. Junto a NM43 flanquean el sitio de la inserción.
NM43	CTgATgTTATCTCTCTTAATggC	D	(6)	Marcador molecular mutante <i>pir2-2</i> . Junto a NM42 flanquean el sitio de la inserción.

* Orientación de los partidores. D: directo, I: inverso.