



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Establecimiento de la localización
subcelular de POL5, UTP18, PRH75
y RRP36 de *Arabidopsis thaliana***

Juan Zaragoza Lillo

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Rosa Micol Ponce

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2022-2023

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

ROSA MICOL PONCE, Investigadora postdoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Juan Zaragoza Lillo como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



María Rosa Ponce Molet



Rosa Micol Ponce

Elche, 21 de junio de 2023.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- La biogénesis del ribosoma	2
II.1.1.- El procesoma SSU	2
II.1.2.- Estudios funcionales previos de las proteínas RRP36, UTP18, POL5 y PRH75 en las levaduras, los humanos y las plantas.....	4
II.2.- La proteína GFP y su aplicación en el estudio de genes	6
II.3.- La tecnología Gateway y su utilización en el estudio de genes.....	7
II.4.- Arabidopsis como sistema modelo para el estudio de genes.....	8
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	10
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	10
IV.1.1.- Nomenclatura genética.....	10
IV.1.2.- Citas bibliográficas.....	11
IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	11
IV.3.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis.....	12
IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri	12
IV.3.2.- Cultivo en maceta y recolección de semillas	12
IV.4.- Condiciones de los cultivos bacterianos	13
IV.5.- Disoluciones.....	14
IV.5.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis.....	14
IV.5.2.- Medios de cultivo para bacterias.....	15
IV.5.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general	15
IV.5.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico.....	15
IV.5.3.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	16
IV.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos	16
IV.6.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos	16
IV.6.1.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis	16
IV.6.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico.....	17
IV.6.2.- Amplificaciones mediante PCR	17
IV.6.3.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa	18
IV.6.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN	18
IV.7.- Transformaciones.....	18
IV.7.1.- Transformación de células bacterianas por electroporación	18
IV.7.2.- Transformación de Arabidopsis	19
IV.8.- Microfotografía y microscopía	19

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
V.1.- Situación del trabajo al inicio del TFM.....	20
V.2.- Localización subcelular de las proteínas de fusión PRH75-GFP y UTP18-GFP	21
V.2.1.- Análisis de las plantas portadoras del transgén <i>PRH75_{pro}:PRH75:GFP</i>	21
V.2.1.1.- Aislamiento de plantas T ₂ de Col-0 y <i>atrh7-2</i>	21
V.2.1.2.- Determinación de la localización subcelular de PRH75	22
V.2.2.- Análisis de las plantas portadoras del transgén <i>UTP18_{pro}:UTP18:GFP</i>	23
V.2.2.1.- Aislamiento de plantas T ₂	23
V.2.2.2.- Determinación de la localización subcelular de UTP18	25
V.3.- Localización subcelular de las proteínas de fusión RRP36-GFP y de POL5-GFP	26
V.3.1.- Secuenciación del transgén <i>RRP36_{pro}:RRP36:GFP</i>	27
V.3.2.- Transferencia de los transgenes a <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y Arabidopsis	28
V.3.3.- Obtención de transformantes <i>RRP36_{pro}:RRP36:GFP</i> y <i>POL5_{pro}:POL5:GFP</i>	30
V.3.4.- Análisis de las plantas T ₂ portadoras de las construcciones <i>RRP36_{pro}:RRP36:GFP</i> y <i>POL5_{pro}:POL5:GFP</i>	32
V.3.5.- Determinación de la localización subcelular de RRP36 y POL5	32
V.4.- Predicciones de la localización de PRH75, RRP36, POL5 y UTP18	34
VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	36
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Modelo del ensamblaje del procesoma SSU y maduración de la partícula pre-40S en la levadura	3
Figura 2.- Dominios estructurales y funcionales del nucleolo vegetal.....	6
Figura 3.- Clonación de un inserto en un vector de expresión <i>Gateway</i>	7
Figura 4.- Diagrama del proceso de construcción de los transgenes y su posterior transferencia a plantas de <i>Arabidopsis</i>	20
Figura 5.- Estructura del gen <i>PRH75 (ATRH7)</i> y efecto de la expresión del transgén <i>PRH75_{pro}:PRH75:GFP</i> en el mutante <i>atrh7-2</i>	22
Figura 6.- Expresión del transgén <i>PRH75_{pro}:PRH75:GFP</i> en células de la raíz de Col-0	23
Figura 7.- Estructura de <i>UTP18</i> , caracterización fenotípica y genotipado de plantas portadoras de la construcción <i>UTP18_{pro}:UTP18:GFP</i>	25
Figura 8.- Expresión del transgén <i>UTP18_{pro}:UTP18:GFP</i> en células de raíz de Col-0	26
Figura 9.- Estructura de <i>RRP36</i> y genotipado de las bacterias de <i>Escherichia coli</i> portadoras de la construcción <i>RRP36_{pro}:RRP36:GFP</i>	27
Figura 10.- Secuencia parcial del clon de destino portador del transgén <i>RRP36_{pro}:RRP36:GFP</i>	28
Figura 11.- Estructura de <i>RRP36</i> y <i>POL5</i> , y genotipado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
Figura 12.- Selección de transformantes T ₁ portadores de las construcciones de interés.....	31
Figura 13.- Estructura de <i>POL5</i> y genotipado de las plantas portadoras de la construcción <i>POL5_{pro}:POL5:GFP</i>	31
Figura 14.- Genotipado de las plantas T ₂ portadoras de la construcción <i>POL5_{pro}:POL5:GFP</i>	32
Figura 15.- Expresión del transgén <i>RRP36_{pro}:RRP36:GFP</i> en células de raíz de Col-0	33
Figura 16.- Expresión del transgén <i>POL5_{pro}:POL5:GFP</i> en células de raíz de Col-0	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Estirpes mutantes de <i>Arabidopsis</i> empleadas en este trabajo	11
Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados en este trabajo	17
Tabla 3.- Estudio del modo de herencia del transgén <i>PRH75_{pro}:PRH75:GFP</i>	22
Tabla 4.- Estudio del modo de herencia del transgén <i>UTP18_{pro}:UTP18:GFP</i>	24
Tabla 5.- Predicciones sobre la localización subcelular de las proteínas de interés.....	34

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El ribosoma es una maquinaria universal y esencial cuya biogénesis consume la mayor parte de los recursos energéticos de cualquier célula y, por tanto, está estrictamente regulada. Estamos estudiando varios genes de *Arabidopsis* que codifican presuntos factores de la biogénesis del ribosoma (RBF) y que pudieran participar en su regulación: *PLANT RNA HELICASE75 (PRH75)*, *U3 SMALL NUCLEOLAR RNA-ASSOCIATED PROTEIN 18 (UTP18)*, *RIBOSOMAL RNA PROCESSING 36 (RRP36)* y *POLYMERASE 5 (POL5)*. No se han publicado estudios funcionales de estos genes en *Arabidopsis*, excepto de *PRH75*, que participa en la maduración del ARNr 18S. Para determinar la localización subcelular de estos supuestos RBF, generamos fusiones traducionales de los genes que los codifican con el de la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control de sus propios promotores. Transferimos los transgenes a plantas *POL5/pol5-1*, *UTP18/utp18-1*, *prh75-1/prh75-1* y a sus respectivos tipos silvestres. Los transgenes *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* y *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* rescataron parcialmente el fenotipo mutante de *atr7-2* y *utp18-1*, respectivamente. Sin embargo, el transgén *POL5_{pro}:POL5:GFP* rescató por completo el fenotipo letal embrionario del mutante *pol5-1*. Además, hemos determinado que las cuatro proteínas son predominantemente nucleolares, que era lo que esperábamos.

Palabras clave: *Arabidopsis*, biogénesis del ribosoma, procesoma SSU, GFP.

The ribosome is a universal and essential machinery whose biogenesis consumes the majority of the energy resources of any cell and, therefore, it is strictly regulated. We are studying several *Arabidopsis* genes encoding putative ribosome biogenesis factors (RBFs): *PLANT RNA HELICASE75 (PRH75)*, *U3 SMALL NUCLEOLAR RNA-ASSOCIATED PROTEIN 18 (UTP18)*, *RIBOSOMAL RNA PROCESSING 36 (RRP36)* and *POLYMERASE V (POL5)*. No functional studies of these genes have been published in *Arabidopsis*, except for *PRH75*, which participates in 18S rRNA maturation. To determine the subcellular localization of these putative RBFs, we generated transgenes containing translational fusions of these genes and the *GFP* gene, driven by their endogenous promoters. We transferred the transgenes to *POL5/pol5-1*, *UTP18/utp18-1* and *prh75/prh75* and their respective wild-types. The *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* and *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* transgenes partially rescued the *atr7-2* and *utp18-1* mutant phenotype, respectively. However, the *POL5_{pro}:POL5:GFP* transgene completely rescued the embryonic lethal phenotype of the *pol5-1* mutant. Furthermore, we have determined that all four proteins are predominantly nucleolar, which was expected.

Keywords: *Arabidopsis*, ribosome biogenesis, SSU proceosome, GFP.

II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- La biogénesis del ribosoma

La biogénesis del ribosoma está estrictamente regulada, ya que consume la mayor parte de los recursos energéticos de cualquier célula. El ribosoma eucariótico 80S está compuesto por una subunidad mayor o 60S y una menor o 40S, compuestas a su vez por ARN ribosómicos (ARNr) y proteínas ribosómicas (PR). El ARNr 18S y alrededor de 33 PR forman la subunidad 40S, mientras que los ARNr 25S (28S en mamíferos), 5,8S y 5S y 47 PR la subunidad 60S. La transcripción de dos diferentes ADN ribosómicos (ADNr) genera los cuatro ARNr: el 45S/47S (en plantas y mamíferos, respectivamente), que da lugar a los ARNr 18S, 25S y 5,8S; y el ADNr 5S, que producirá el ARNr 5S. La transcripción del ADNr 45S se produce en el nucleolo y requiere la actividad de la ARN polimerasa I para generar un transcrito primario policistrónico denominado pre-ARNr 45S. La ARN polimerasa III transcribe el ADNr 5S en el citoplasma (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

Los genomas de las plantas contienen cientos de genes de ADNr 45S y ADNr 5S, que están organizados en distintos cromosomas. En *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*), la mayoría de las copias de ADNr 45S se localizan en tándem en los cromosomas 2 y 4, en las regiones organizadoras del nucleolo (NOR). La región que codifica los ARNr 18S, 5,8S y 25S en el ADNr 45S se encuentran separadas por las regiones ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) e ITS2 y flanqueada a su vez por dos espaciadores externos, el 5'-ETS y 3'-ETS. Además, las repeticiones del ADNr 45S se encuentran separadas entre sí por espaciadores intergénicos (IGS), que no se transcriben (Urawa *et al.*, 2001; Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

La síntesis de los ARNr maduros 18S, 5,8S y 25S a partir del producto primario de la transcripción del ADNr 45S, denominado pre-ARNr 45S (en las plantas, 35S en las levaduras y 47S en los mamíferos), se produce a través de cortes endo y exorribonucleolíticos y modificaciones químicas de ribonucleótidos. En las plantas existen dos rutas alternativas del procesamiento del pre-ARNr 45S: la ruta del ITS1 primero y la del 5'-ETS primero. La ruta "5'-ETS primero" comienza con la escisión del 5'-ETS del pre-ARNr 45S, y después ocurre la del ITS1. La ruta "ITS1 primero" es la prevalente en *Arabidopsis* y comienza con la escisión del ITS1 y posteriormente se produce la del 5'-ETS (Palm *et al.*, 2019).

II.1.1.- El procesoma SSU

En la levadura, el procesoma SSU [*small subunit* (la subunidad 40S del ribosoma)] está compuesto por alrededor de 70 FBR, la mayoría asociadas en subcomplejos. Se forma

cotranscripcionalmente entorno al pre-ARNr 35S, al que modifica, ensamblándolo con las PR de la subunidad 40S (de la Cruz *et al.*, 2015). El procesoma SSU coordina la organización de la subunidad 40S en las primeras etapas de su ensamblaje, lo que implica el plegamiento y procesamiento del pre-ARNr.

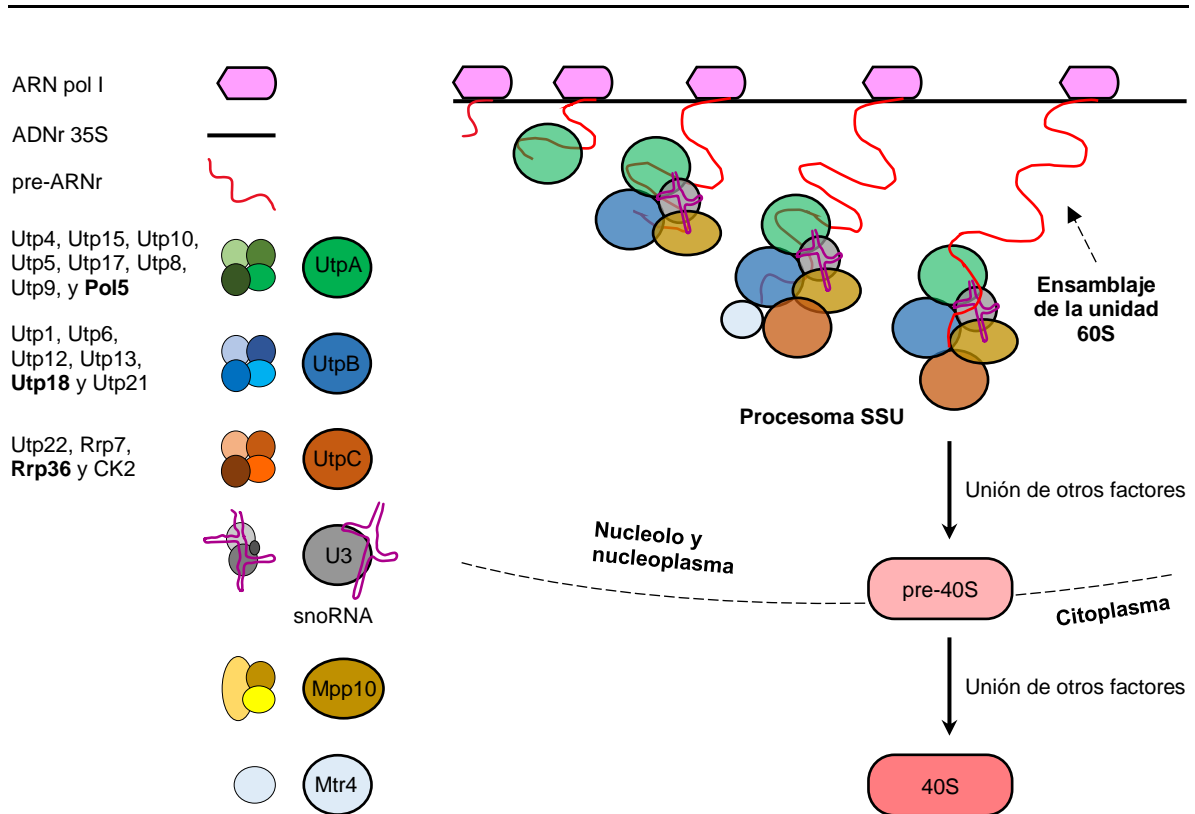


Figura 1.- Modelo del ensamblaje del procesoma SSU y maduración de la partícula pre-40S en la levadura. Se representa la unión secuencial y cotranscripcional al pre-ARNr de los subcomplejos que forman el procesoma SSU, y el ensamblaje independiente de la subunidad 60S con el pre-ARNr naciente. Se representa también la formación de la partícula pre-40S, precursora de la subunidad 40S, y su traslocación al citoplasma, donde completa su maduración. Se han dibujado con distintos colores los participantes: la ARN pol I (en rosa), el ADNr 35S (línea negra), el pre-ARNr 45S (línea roja), los subcomplejos UtpA (verde), UtpB (azul oscuro), UtpC (naranja), la RNP U3 con el snoARN (círculo gris y línea morada), el subcomplejo Mpp10 (amarillo) y la helicasa de ARN Mtr4 (azul claro). Sólo se detallan las proteínas que forman los subcomplejos UtpA, UtpB y UtpC, por pertenecer a ellos tres de las proteínas cuyos presuntos ortólogos de *Arabidopsis* se han estudiado en este TFM y que se resaltan en negrita. Los dibujos no están representados a escala. Tomado de Vázquez Pagán, 2022.

El complejo U3 snoRNP (*U-three small nucleolar ribonucleoprotein*) desempeña un papel fundamental en el procesoma SSU, y está compuesto por el ARN nucleolar pequeño (snoRNA) U3 y una serie de proteínas adicionales. Este subcomplejo se asocia con otros:

el UtpA, UtpB, UtpC y Mpp10 que también forman parte del procesoma SSU (Figura 1, en la página 3). En las plantas, no se ha observado directamente el procesoma SSU, pero se han identificado homólogos estructurales de la mayoría de sus proteínas, en fracciones nucleolares purificadas de *Arabidopsis*, lo que sugiere su existencia también en las plantas (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

II.1.2.- Estudios funcionales previos de las proteínas RRP36, UTP18, POL5 y PRH75 en las levaduras, los humanos y las plantas

La Rrp36p (Ribosomal RNA Processing 36) de *Saccharomyces cerevisiae* es una proteína nucleolar y esencial, que forma parte del subcomplejo UtpC del procesoma SSU (Figura 1, en la página 3). La pérdida de función de Rrp36p dificulta el procesamiento del pre-ARNr 35S, lo que conlleva una disminución de los niveles del ARNr 18S maduro. Se ha demostrado que la función del ortólogo humano está conservada (Gérus *et al.*, 2010), pero no se ha estudiado en las plantas.

La Utp18 de *Saccharomyces cerevisiae* también es esencial y un componente del subcomplejo UtpB del procesoma SSU (Figura 1, en la página 3). Utp18 es una proteína adaptadora del exosoma nucleolar, como también lo es Nop53, cuyo ortólogo funcional de *Arabidopsis* es SMO4 (Micol-Ponce *et al.*, 2020). Utp18 y Nop53 dirigen a la helicasa de ARN Mtr4 (mRNA transport 4), un cofactor del exosoma, a fragmentos procesados de la región 5'-ETS del pre-ARNr 35S y del pre-ARNr 5,8S, respectivamente, destinados a su degradación (Thoms *et al.*, 2015). Los ortólogos de Utp18 y de Nop53, incluyendo los de *Arabidopsis*, poseen un dominio AIM (arch interaction motif) conservado, para su interacción con Mtr4, lo que sugiere que podrían tener la misma función en los ortólogos de *Arabidopsis*. Sin embargo, en ensayos de coinmunoprecipitación con la proteína de fusión MTR4-GFP de *Arabidopsis* no se han aislado SMO4 y UTP18, lo que podría deberse a que la GFP impide la interacción, o que no interaccionan en esta especie (Lange *et al.*, 2014). En las plantas, UTP18 no se ha estudiado.

La Pol5p (DNA Polymerase V) de *Saccharomyces cerevisiae* es una proteína esencial que forma parte del subcomplejo UtpA del procesoma SSU (Figura 1, en la página 3). Se localiza en el núcleo y su pérdida de función inhibe la producción de ARNr (Shimizu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). Interviene en la maduración del ARNr 25S, y en el ensamblaje y la maduración de las dos subunidades del ribosoma (Ramos-Sáenz *et al.*, 2019; Braun *et al.*, 2020). Se ha demostrado también que Pol5p se une al promotor del ADNr 35S, participando directamente en la activación de su transcripción (Shimizu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). El ortólogo humano es la proteína supresora de tumores Mybbp1a

(Myb-binding protein 1a), que es predominantemente nucleolar y parece tener una función antagónica a la de Pol5p, ya que reprime la transcripción del ADNr 47S (Tan et al., 2012). El presunto ortólogo en las plantas no se ha estudiado.

En *Arabidopsis*, la proteína PRH75 (PLANT RNA HELICASE 75), también denominada ATRH7, no es esencial y está involucrada en la maduración de los ARNr, el desarrollo de las plantas y su tolerancia al frío. Se han descrito dos alelos, *atr7-1* y *atr7-2*, cuyo fenotipo de hojas apuntadas es el característico de los genes que codifican FBR. En dichos mutantes se acumulan precursores del ARNr 18S, defecto que se incrementa a bajas temperaturas (Huang et al., 2016). Su ortóloga humana es DDX21 (DEAD-box RNA helicase 21), juega un papel dual en la biogénesis del ribosoma, como regulador de la transcripción del ADNr 47S y en el procesamiento del pre-ARNr 47S. Por otro lado, en el nucleoplasma, DDX21 también activa la transcripción de los genes que codifican PR y snoRNA, lo que sugiere un papel en la coordinación de la síntesis de los componentes necesarios para la biogénesis del ribosoma (Calo et al., 2015). Sin embargo, una función de PRH75 en la regulación de la transcripción del ADNr 45S o en la de los genes que codifican PR o snoRNA, no se ha explorado.

II.1.3.- El nucleolo en células vegetales

El nucleolo es una estructura subcelular que se encuentra en el núcleo. Aunque su tamaño y apariencia pueden variar, generalmente se presenta como una región densa y redondeada. El nucleolo desempeña un papel crucial en la síntesis de ribosomas, pero también es clave para la percepción del estrés celular (Boulon et al., 2010). Está formado fundamentalmente por proteínas (85 a 90%) y ARN (5 a 10%), mientras que el ADNr es minoritario (Gerbi y Borovjagin, 1997; Shaw y Brown, 2012). El nucleolo es dinámico, carece de membrana, y se encuentra estructurado en compartimentos funcionales distinguibles con microscopía electrónica de barrido: los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG), la cromatina nucleolar, las vacuolas nucleolares (VNo) y el nucleolonema (Figura 2, en la página 6; Kalinina et al., 2018). Los CF se consideran los puntos de ensamblaje de complejos asociados a la transcripción del ADNr 45S (Figura 1, en la página 3). En ellos se encuentran los ADNr, aunque su transcripción no se produce en los CF sino en el CFD, que ocupa la mayor parte del volumen nucleolar (hasta el 70%). Posteriormente, el procesamiento de los pre-ARNr se lleva a cabo en el CFD y en los CG (Kalinina et al., 2018).

Los nucleolos vegetales también suelen contener una vacuola, que ocupa su región central (Figura 2, en la página 6) y cuya función se desconoce, aunque se ha sugerido que

son almacenes temporales de snoRNP y los snRNP, complejos riborproteicos implicados en la maduración de los ARNr y en el splicing, respectivamente (Kalinina *et al.*, 2018).

Los grupos de cromatina que a menudo se asocian con el nucleolo (CAN), pero no forman parte de él (Figura 2) son fundamentalmente de naturaleza heterocromática y comprenden regiones subtelméricas con elementos transponibles y pseudogenes. Sin embargo, los CAN también incluyen repeticiones de ADNr activos, que generalmente se organizan en tándem en los NOR.

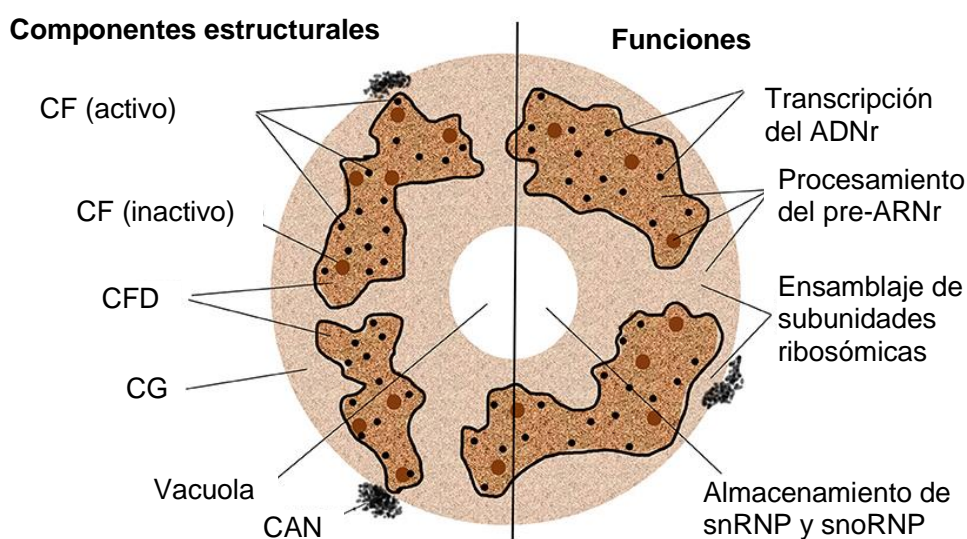


Figura 2.- Dominios estructurales y funcionales del nucleolo vegetal. CF: centro fibrilar, CFD: componente fibrilar denso, CG: componente granular, CAN: cromatina asociada al nucleolo. Modificado a partir de Kalinina *et al.*, 2018.

II.2.- La proteína GFP y su aplicación en el estudio de genes

Las proteínas fluorescentes son de gran utilidad en la investigación básica. La primera que se aisló fue la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria*, cuya presencia confiere autofluorescencia a este organismo marino. La modificación genética del gen de la GFP ha permitido la obtención de otras variantes, para su uso en otras longitudes de onda del espectro de la luz UV. Las proteínas fluorescentes son particularmente adecuadas para aplicaciones *in vivo*, ya que no requieren para su detección la aplicación de compuestos o tratamientos previos específicos, a diferencia de otros genes testigos populares como el gen que codifica la β -glucuronidasa (GUS), que requiere para su visualización el uso de sustratos específicos cromogénicos sobre los que actuar la enzima (Grebenok *et al.*, 1997). Algunas de sus aplicaciones incluyen la identificación de genes y el estudio de su función y regulación, la manipulación de la

expresión génica y el estudio de los procesos involucrados en la síntesis proteica. Otra de sus aplicaciones es la identificación de elementos activadores y supresores implicados en la regulación de la expresión génica espacio-temporal de cualquier organismo, incluidas las plantas (Fernández-Abalos *et al.*, 1998).

II.3.- La tecnología Gateway y su utilización en el estudio de genes

La tecnología Gateway se basa en la clonación por recombinación y ha sido ampliamente adoptada por las diferentes comunidades científicas, debido a sus beneficios en proyectos que requieren clonación sistemática, ensamblaje modular y expresión en diversos contextos. Esta tecnología ha sido diseñada para unir fragmentos de ADN en un orden, orientación y marco de lectura predefinidos, lo que permite la construcción de unidades de expresión de manera más rápida y eficaz que los métodos iniciales de clonación, basados en el uso de restrictasas y ligasas. Esta tecnología se fundamenta en el proceso de integración y escisión del bacteriófago lambda (λ) en el genoma de *Escherichia coli* e implica dos reacciones sucesivas de recombinación, llevadas a cabo por la BP y LR clonasa (Karimi *et al.*, 2007). Se han generado colecciones de vectores para la obtención de diferentes módulos de expresión mediante clonación Gateway.

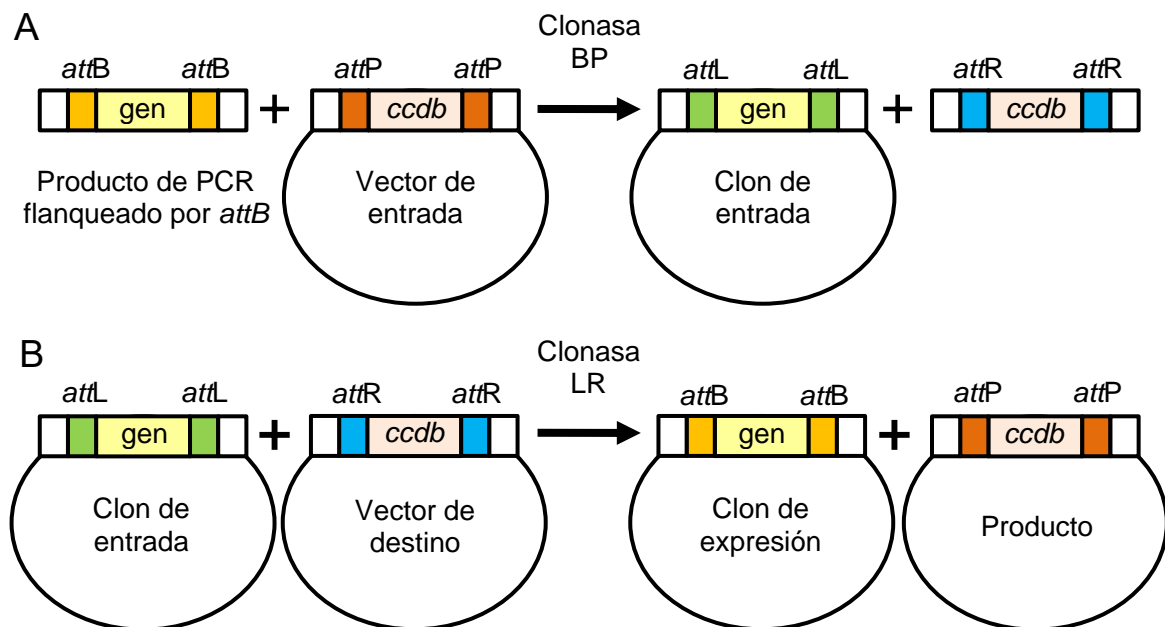


Figura 3.- Clonación de un inserto en un vector de expresión Gateway. Se representa esquemáticamente el proceso de generación de los clones de (A) entrada y (B) destino para un gen amplificado mediante PCR empleando cebadores con secuencias *attB* en sus extremos 5'. Tomada de Micol Ponce, 2011, que a su vez la modificó del catálogo Gateway Technology de Invitrogen.

La reacción BP consiste en la transferencia de un fragmento de ADN de interés que está flanqueado por dos sitios *attB* a un vector de entrada que posee dos sitios *attP*. Tras la recombinación entre los sitios *attB* y *attP* correspondientes, el fragmento de ADN se inserta en vector de entrada y queda flanqueado por dos sitios *attL* (Figura 3A, en la página 7; Karimi et al., 2007). Esta nueva molécula se denomina clon de entrada.

En una segunda etapa, se transfiere el inserto del clon de entrada a un vector de destino que contiene dos sitios *attR*. Tras la recombinación de los sitios *attL* del clon de entrada y los *attR* del vector, el ADN de interés se integra en el vector de destino generando un clon de destino, y quedando nuevamente flanqueado por sitios *attB*, como al inicio del proceso, lo que permite transferir el inserto a otros vectores Gateway (Figura 3B, en la página 7; Karimi et al., 2007).

II.4.- Arabidopsis como sistema modelo para el estudio de genes

Arabidopsis, es una angiosperma dicotiledónea de la familia *Brassicaceae* que se convirtió en el modelo vegetal por excelencia, y que sido utilizada para el análisis genético durante más de cuarenta años. Es una planta que es fácil de cultivar debido a su pequeño tamaño y un ciclo de vida corto, y que produce gran cantidad de descendientes. Además, fue la primera planta cuyo genoma se secuenció, lo que permitió una comparación más completa de los procesos conservados en todos los eucariotas, identificar funciones genéticas específicas de las plantas y establece formas rápidas y sistemáticas para identificar ortólogos en otras especies vegetales (Meyerowitz, 1987).

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La investigación en el laboratorio de M.R. Ponce se centra en el estudio de los mecanismos de regulación génica mediada por microARN (miARN), utilizando *Arabidopsis* como organismo modelo. Su grupo identificó mutaciones supresoras que restauran la morfología silvestre en un mutante portador en homocigosis de un alelo hipomorfo del gen *ARGONAUTE1* (*AGO1*), principal efector del silenciamiento mediado por miARN. Las mutaciones supresoras se denominaron *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*; Micol-Ponce *et al.*, 2014) y el estudio de dos de los genes *MAS* derivó en dos tesis del laboratorio: *MAS2* (Sánchez-García *et al.*, 2015) y *MAS5* (Cabezas-Fuster *et al.*, 2022). El gen *MAS2* codifica el ortólogo de la NFK β Activating Protein (NKAP) humana que interaccionó en ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H) con proteínas implicadas en la biogénesis del ribosoma (Sánchez-García *et al.*, 2015). Por ello, actualmente la investigación del grupo de M.R. Ponce se ha centrado en determinar si existe una relación entre la ruta de regulación génica mediada por miARN y la biogénesis del ribosoma y en estudiar los mecanismos que subyacen en la regulación de este último proceso.

Los ortólogos de la levadura y humanos de las proteínas de *Arabidopsis* RRP36, POL5, UTP18 y PRH75 participan en la regulación de la biogénesis del ribosoma, pero su función en este proceso no se ha explorado en las plantas. Previamente al inicio de este TFM, se obtuvieron mutantes insercionales, y probablemente nulos, de los genes *POL5*, y *UTP18* (Martínez Fenoll, 2022) y construcciones para establecer la localización subcelular de sus productos proteicos y rescatar el fenotipo de los mutantes obtenidos (Vázquez Pagán, 2022). Los mutantes *pol5-1* y *utp18-1* resultaron ser letales embrionarios, mientras que se utilizó el mutante *atr7-2*, previamente descrito por otros autores (Huang *et al.*, 2016), que era viable y su fenotipo el característico de los alelos de pérdida de función de genes que codifican FBR (Martínez Fenoll, 2022). Para la obtención de las construcciones se utilizó la tecnología Gateway, obteniéndose los clones de destino de los transgenes *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* y *POL5_{pro}:POL5:GFP*, pero no se transformó *Agrobacterium tumefaciens* ni *Arabidopsis*. Por su parte, los transgenes *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* y *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* se transfirieron a plantas silvestres, *atr7-2* y *UTP18/utp18* (Vázquez Pagán, 2022), pero no se analizaron.

El objetivo de este TFM ha sido evaluar la capacidad de restaurar el fenotipo silvestre en los mutantes transformados con los transgenes y determinar en estas plantas la localización subcelular de las proteínas, gracias a sus fusiones con la GFP que producen la expresión de los transgenes.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis doctorales previas, Trabajos de Fin de Grado y Trabajos de Fin de Máster, realizados en los laboratorios de José Luis Micol y María Rosa Ponce, y que pueden consultarse en: <https://genetics.edu.umh.es>. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos de dichos trabajos, ya que corresponden a protocolos bien establecidos en ambos laboratorios.

Se utilizan numerosas abreviaturas y acrónimos, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida del Sistema Internacional, y otras específicamente empleadas en Biología Molecular. Además, se ha procurado obedecer la normativa de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos utilizados en este trabajo. No obstante, se ha preferido emplear los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por la IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente.

Como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una “s” minúscula: se escribe “el ARNr” y “los ARNr” o “el FBR” y “los FBR”. Se escriben en cursiva algunos anglicismos de uso común, que carecen de una traducción al español generalmente aceptada.

IV.1.1.- Nomenclatura genética

Se mantiene la nomenclatura de los genes, proteínas y alelos que ha consagrado la comunidad de científicos de cada organismo, que incluye la regla general de que los genes y alelos se escriban en cursiva y las proteínas en tipografía normal. Por tanto, si la referencia es al gen o la proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, aparecerá la primera letra con mayúscula y el resto con minúscula, por ejemplo, *Pol5* y *Pol5*, respectivamente. Si se refiere a genes o proteínas de *Arabidopsis* o humanas el nombre abreviado se escribe con mayúsculas (*POL5* y *POL5*). Los alelos de un gen se indican con letras mayúsculas para el silvestre (por ejemplo, *Pol5* o *POL5*) y minúsculas para los mutantes, con un guion seguido de un número para distinguir el alelo (*pol5-1*, primer alelo mutante descrito del gen *POL5*).

Los genes de *Arabidopsis* también se identifican con un código de letras y números en la forma ATXGYYYYY, sin cursiva. Las letras AT se corresponden con las iniciales del nombre científico de la especie, *Arabidopsis thaliana*. La X hace referencia al cromosoma

al que pertenece el gen. La G indica que se trata de un gen nuclear, y los cinco dígitos finales, YYYYYY, se corresponden con el orden en que se encuentra en el cromosoma, con relación al telómero superior. En este trabajo, los mutantes homocigóticos se muestran con el nombre del alelo mutante (por ejemplo, *pol5-1*) y solo se especifica el genotipo completo, en el que los alelos en cromosomas homólogos se separan con una barra (por ejemplo, *POL5/pol5-1*), en el caso de los heterocigotos.

IV.1.2.- Citas bibliográficas

Se ha usado EndNote (<https://endnote.com/>) para gestionar las citas bibliográficas, que se ordenan cronológicamente, siguiendo un orden alfabético para los autores de los artículos publicados el mismo año. Todos los autores de un artículo se mencionan en la bibliografía, mientras que en el texto solo se hace referencia al primero de ellos, salvo cuando son dos. También se citan como fuentes, en ocasiones, direcciones de Internet (URL; Uniform Resource Locator), en el formato <https://...>, aun sabiendo que muchas son temporales.

IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo

En este trabajo se han empleado los ecotipos o estirpes silvestres Landsberg *erecta* (Ler) y Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., y las mutantes que se indican en la Tabla 1, todas ellas probablemente nulas y procedentes de tres diferentes colecciones de mutantes insercionales. Las semillas de estas estirpes fueron obtenidas del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC; <https://arabidopsis.info/>), replicadas por autofecundación en nuestro laboratorio, y conservadas en tubos *eppendorf* a 4°C. También se han utilizado las estirpes DH5 α de *Escherichia coli*, y C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Tabla 1.- Estirpes mutantes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo

Estirpe	Fondo genético	Posición del ADN-T	Gen	Proteína
<i>atr7-2</i> (SALK_060685) ^{a, b}	Col-0	8º exón (13)	AT5G62190	PRH75
GK-865A05 ^c	Col-0	2º exón (2)	AT5G14050	UTP18
<i>rrp36-1</i> (SALK_026222C) ^b	Col-0	3'-UTR (9)	AT1G12650	RRP36
GT_3_7280 ^d	Ler	5'-UTR (8)	AT5G64420	POL5

^aHuang *et al.*, 2016, ^bO'Malley *et al.*, 2015; ^cRosso *et al.*, 2003; ^dSundaresan *et al.*, 1995. Entre paréntesis, en la tercera columna, se indica el número de exones del gen.

IV.3.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis

IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.5.1, en la página 14). La siembra de las semillas de Arabidopsis se realizó tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, y, durante 8 min, en una disolución de etanol al 70%, haciendo a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril. La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron de 104 semillas por placa, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio con ayuda de una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas de Petri se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que supone una barrera efectiva para los aerosoles, sin impedir el intercambio de gases con el exterior. Las placas inoculadas con las semillas se estratificaron durante al menos 24 h, a 4°C y en oscuridad, a fin de sincronizar su germinación, tras lo que se cultivaron a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, con iluminación continua de $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16, en las que el flujo de aire es permanentemente ascendente.

El crecimiento de las plantas 14 o 21 días después de la estratificación (dde) es tal que se puede apreciar a simple vista la arquitectura de la roseta y de sus hojas vegetativas, pudiendo distinguir a las mutantes de las silvestres en base a sus diferencias morfológicas. Las plantas de interés fueron después trasplantadas a macetas, en las que completaron su ciclo de vida en las condiciones que se detallan en el apartado siguiente.

IV.3.2.- Cultivo en maceta y recolección de semillas

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 x 50 cm, con alveolos, cada uno de 5 x 5 cm (diámetro x altura), colocadas en cubetas de 7 cm de profundidad. En cada alveolo se introdujo una maceta de rejilla de 5 x 5 cm (diámetro x altura), previamente rellena con el sustrato. Estas macetas impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, y facilitan la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. Se usó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; $105\text{-}125 \text{ kg/m}^3$), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; $80\text{-}100 \text{ kg/m}^3$) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobnull Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una planta.

Durante un día, los cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente perforado, a fin de evitar una excesiva condensación de agua. Cuando se produjo el alzado y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aisló a las plantas en cilindros de plástico transparente, denominados aracones (aracons; Beta Tech), que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas.

Para obtener plantas para la transformación de sus órganos florales por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, se sembró *Arabidopsis* en masa en macetas de polietileno rígido de 10 × 10 × 10 cm (largo × ancho × alto), colocadas en cubetas de 7 cm de profundidad, que se cubrieron con un plástico transparente. Este último fue retirado un día después, a fin de que las plantas crecieran hasta alcanzar el tamaño óptimo para su transformación.

Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara climatizada visitable, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72TI2/D/VHO 160 W 1500 SF, totalizando unos $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. Las bandejas permanecieron subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se hizo dos veces por semana, mediante la adición de una cantidad saturante de medio mínimo ATM (apartado IV.5.1, en la página 14). Cuando la floración se interrumpió, se suspendió el riego, propiciándose el secado de las plantas, que se mantuvieron en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

Para la recolección de las semillas de una planta seca, fruto de su autofecundación, se presionó contra un colador, que se sujetó sobre un papel de filtro en el que cayeron las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta, que se acumuló sobre el papel, fue cribada a través de un colador adecuado, para eliminar en lo posible todas las partículas con un tamaño superior al de las semillas. Estas últimas se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a 4°C .

IV.4.- Condiciones de los cultivos bacterianos

Los cultivos en medio líquido se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos 2 veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante el período de incubación. Se usó un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 44, 4000 o 4260), con una agitación de 225 rpm, y una temperatura de 37°C para el cultivo de *Escherichia coli*, o de 28°C para el de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los cultivos en placas de Petri se inocularon con 250-500 μl de precultivo líquido, que fue esparcido por el medio haciendo que rodaran sobre su superficie 6 perlas de vidrio estériles, de 3 mm de diámetro. Las placas inoculadas con las bacterias se incubaron en posición invertida, durante 24 h a 37°C para el cultivo de *Escherichia coli*, o durante 48 h a 28°C para el de *Agrobacterium tumefaciens*.

IV.5.- Disoluciones

Todas las disoluciones que se mencionan en este apartado se prepararon utilizando agua desionizada, con una resistividad media de 15 $\text{M}\Omega/\text{mm}^2\cdot\text{m}$. Además, se conservaron a temperatura ambiente, salvo aquellas para las que se indica una temperatura diferente. Las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1 kg/cm^2 y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22 o 0,45 μm de diámetro de poro.

IV.5.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis

Medio mínimo ATM (líquido): KNO_3 5 mM; KH_2PO_4 2,5 mM; MgSO_4 2 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM; FeNaEDTA 51 μM ; H_3BO_3 70 μM ; MnCl_2 14 μM ; CuSO_4 0,5 μM ; ZnSO_4 1 μM ; NaMoO_4 0,2 μM ; NaCl 10 μM , y CoCl_2 0,01 μM (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO_3 1 M; 2,5 ml de KH_2PO_4 1 M; 2 ml de MgSO_4 1 M; 2 ml de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM, y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron por filtración. Las disoluciones madre de las sales se añadieron a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente: H_3BO_3 70 mM; MnCl_2 14 mM; CuSO_4 0,5 mM; ZnSO_4 1 mM; NaMoO_4 0,2 mM; NaCl 10 mM, y CoCl_2 0,01 mM. Esta se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H_3BO_3 ; 2,77 g de $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 124 mg de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 287 mg de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 48,7 mg de $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 584,4 mg de NaCl , y 2,38 mg de $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Por último, se añadió agua hasta 1 l.

Medio GM (Germination Medium; sólido): NH_4NO_3 10,3 mM; H_3BO_3 50,1 μM ; CaCl_2 1,5 mM; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; Na_2EDTA 55,4 μM ; MgSO_4 0,75 mM; $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 μM ; $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM ; KI 2,5 μM ; KNO_3 9,4 mM; KH_2PO_4 0,62 mM; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 μM ; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 0,6% m/v de Gelrite.

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES. Se agitó la suspensión en un agitador magnético hasta la disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 5 M y KOH 1 M (este sirvió para aproximar el pH lo máximo posible). Posteriormente, se ajustó el volumen a 1 l, se añadieron 6 g de Gelrite, y se esterilizó en autoclave. Tras su esterilización, se mantuvo durante 30 min en un baño a 55°C y antes de su vertido en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Las placas de Petri con medio sólido GM se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y bien precintadas.

IV.5.2.- Medios de cultivo para bacterias

LB (Luria - Bertani) líquido: 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura, y 1% m/v de NaCl. Para su preparación se añadieron, a 800 ml de agua, 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se agitó la suspensión en un agitador magnético hasta la disolución de todos sus componentes y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 5 M. Por último, se ajustó el volumen a 1 l y se esterilizó en autoclave.

LB sólido: 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura; 1% m/v de NaCl, y 1,5% m/v de agar bacteriológico europeo (Pronadisa). Para su preparación se añadieron 15 g de agar bacteriológico al medio LB líquido antes de esterilizarlo en autoclave. Tras su esterilización, se mantuvo durante 30 min en un baño a 55°C y se vertió en placas de Petri de 9 cm de diámetro, en una cabina de flujo laminar horizontal. Las placas de Petri se conservaron a 4°C, en posición invertida y bien precintadas.

Algunos de estos medios de cultivo se suplementaron con 50 mg/l (kanamicina) o 25 mg/l (rifampicina), después de su esterilización en autoclave y cuando ya estaba a 55°C. Los antibióticos procedían de disoluciones madre, que se encontraban a -20°C a concentraciones 1.000 veces superiores a las de trabajo.

IV.5.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general

IV.5.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8; Na₂EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M. Se preparó a partir de las disoluciones madre Tris-HCl 1 M pH 8; Na₂EDTA 0,5 M pH 8, y NaCl 5 M. Se conservó hasta un mes a 4°C.

SDS al 20%: Se preparó disolviendo, a una temperatura de 68°C, 100 g de SDS (dodecil sulfato de sodio) en 500 ml de agua, y ajustando el pH a 7,2 con HCl 1 N.

Acetato de potasio 5 M pH 7,5: Se preparó disolviendo 49,1 g de acetato de potasio (KCH_3COO) en 100 ml de agua, y ajustando el pH a 7,5 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases.

Acetato de sodio 3 M pH 5,2: Se preparó disolviendo 12,3 g de acetato de sodio (NaCH_3COO) en 50 ml de agua, y ajustando el pH a 5,2 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases. Por último, se esterilizó en autoclave.

IV.5.3.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa

Tampón TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de ácido acético glacial, y Na_2EDTA 50 mM. Para preparar 1 l de tampón se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial, y 100 ml de Na_2EDTA 0,5 M pH 8.

Tampón de carga 6x: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y Na_2EDTA 10 mM.

Marcador de peso molecular: Se diluyó el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en el tampón de carga hasta una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se usaron 10 μl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a -20°C .

IV.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.6.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos

IV.6.1.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis

El ADN genómico usado como molde en las amplificaciones por PCR (Mullis *et al.*, 1986) se purificó utilizando una versión simplificada del método de Dellaporta *et al.* (1983). Para ello, se introdujo en un tubo *ependorf* el material vegetal, una hoja de plantas 14 o 21 dde, y se añadieron 500 μl de tampón de extracción y 3 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, esterilizadas en autoclave. La muestra se maceró a 30 Hz durante 3 min en un macerador automático (MM400; Retsch), se añadieron 35 μl de SDS al 20%, y se incubó durante 5 min a 65°C . Se añadieron 130 μl de KCH_3COO 5 M, incubando la muestra 8 min a 4°C , y centrifugándola durante 10 min a 13.500 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo *ependorf*, y se precipitó el ADN, incubando la muestra con 640 μl de isopropanol y 60 μl de NaCH_3COO 3 M durante 20 min a -20°C . Se centrifugó durante 10 min a 12.500 rpm, eliminando el sobrenadante por decantación y lavando el precipitado con 300 μl de etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo durante 5 min a 13.500 rpm, se retiró el sobrenadante, y se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió el ADN genómico en 50-100 μl de agua (según el material vegetal de partida), y se conservó a -20°C .

IV.6.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico

Se realizaron aislamientos de ADN a pequeña escala (*minipreps*), a partir de cultivos bacterianos de 3 ml de medio LB suplementado con el correspondiente antibiótico (apartado IV.5.2, en la página 15), usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) y las instrucciones del fabricante. Se eluyó el ADN plasmídico en 50 μ l de agua, se determinó su concentración y pureza con un espectrofotómetro, y se conservó a -20°C .

IV.6.2.- Amplificaciones mediante PCR

Se realizaron amplificaciones mediante PCR a partir de ADN genómico de *Arabidopsis* o ADN plasmídico de bacterias. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l, en tubos *ependorf* de 0,2 ml, y en termocicladores Bio-Rad T100. Se usó la polimerasa de ADN GoTaq G2 Flexi (Promega) a una concentración final de 0,04 U/ μ l y los oligonucleótidos empleados como cebadores (Tabla 2), y los desoxirribonucleótidos, a 0,4 μ M y 0,2 mM, respectivamente.

Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado de las líneas insercionales	GT_3_7280 LP	TGATGCAGTCTAGTTGTTCCG
	GT_3_7280 RP	CCACAGGTATAGGCTTAGGCC
	GK-interno	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT
	SALK-151535LP	AAAGTTTGACAAAATTGGCCC
	SALK-151535RP	ACACAGCTGAAACGACCTGTC
	SALK-043817 LP	TCTCACTGCCATTGGTAATTG
	SALK-043817 RP	GTTCCAGGGCATTTCCTTTAG
	DS3-1	ACCCGACCCCATCGTATCGGT
Genotipado de las colonias de bacterias	RRP36p:RRP36:GFP_F2	CCGAGTCTACTCGGGACG
	RRP36p:RRP36:GFP_R2	TTCCTCTGCTCGACGATAGG
	SALK-116493_RP	TGTAAACATAGACATTCATGCATG
Secuenciación	M13F	CAAACCTGGGTAAGAGAAGGC
	M13R	CAGGAAACAGCTATGACCATGATT
	GFP_ Rev	CGGAGACGGCTGTCACCAG
	attB1-RRP36	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTCATGAAAGGAGCTGGTAAGTTT

Los programas de PCR incluyeron una etapa previa a 94°C durante 3 min, seguida de 35 o 40 ciclos en los que se repitió una fase de 30 s a 94°C para la desnaturalización de los moldes, otra de 30 s a la temperatura de apareamiento para la hibridación de los

cebadores (55-60°C), y una fase final a 72°C para la polimerización, de duración variable según el tamaño del fragmento a amplificar, asumiendo que la polimerasa utilizada sintetiza ADN a razón de 1 kb/min. Por último, se programó una etapa, no cíclica, de 7 min a 72°C, para rellenar las moléculas bicatenarias con colas protuberantes en 5'.

IV.6.3.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se emplearon geles de agarosa al 0.8-1% m/v, y como electrolito, TAE 1×, que se preparó a partir de tampón TAE 50× (apartado IV.5.3.2, en la página 16). Se disolvió la agarosa en TAE 1× por calentamiento en un microondas, y una vez enfriada la disolución a 55°C, se añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las electroforesis se hicieron en cubetas horizontales, a voltaje constante de 100 V, y durante 30-40 min. Para visualizar las moléculas de ADN, se iluminaron los geles con luz UV de 312 nm, y se tomaron fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

IV.6.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

Se utilizó la variante del método de Sanger semiautomatizada, que se basa en el uso de didesoxinucleótidos terminadores (Smith *et al.*, 1986) marcados con fluorocromos. Las secuencias fueron obtenidas por STAB VIDA, empresa a la que se enviaron muestras que contenían 1.500 ng del ADN plasmídico obtenido de una minipreparación y disoluciones 10 µM (5 µl) de cada cebador de secuenciación (Tabla 2).

IV.7.- Transformaciones

IV.7.1.- Transformación de células bacterianas por electroporación

Se añadieron 100 µl de una suspensión de células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 electrocompetentes, y 1 µl de una disolución de ADN plasmídico (20 ng), obtenida tal como se describe en el apartado IV.6.1.2, en la página 17, en cubetas de electroporación de 2 mm, previamente enfriadas en hielo. Se utilizó un Electroporator 2510 (Eppendorf), programando un pulso de 1.700 V y 5,6 ms. Tras la electroporación, se añadieron 500 µl de medio LB líquido (apartado IV.5.2, en la página 15) a las células, que se transfirieron a tubos *ependorf*, y se incubaron durante 2 h a 28°C y 225 rpm. La inoculación de las células en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con kanamicina y rifampicina se realizó como se describe en el apartado IV.4, en la página 13, incubándose 48 h a 28°C.

IV.7.2.- Transformación de Arabidopsis

Para la transferencia de los transgenes de los genes de interés a Arabidopsis, las plantas se transformaron por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, utilizando una versión modificada del método de Clough y Bent (1998), que deriva a su vez del de Bechtold y Pelletier (1998).

Las plantas se cultivaron tal como se indica en el apartado IV.3.2, en la página 12, hasta que alcanzaron el tamaño óptimo para su transformación, de unos 10 cm de altura, estado en el que presentan muchos capullos florales sin abrir y pocos frutos.

Se prepararon precultivos de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 en 3 ml de medio LB líquido suplementado con kanamicina y rifampicina (apartado IV.5.2, en la página 15), que se inocularon con bacterias obtenidas en placas de Petri, y conservadas a 4°C. Tras una incubación de 24 h a 28°C y 225 rpm, se tomaron 200 µl de los precultivos para inocular 200 ml de medio LB líquido suplementado con kanamicina y rifampicina, en botellas de 500 ml. Estos cultivos se incubaron a 28°C y 225 rpm hasta que su densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) alcanzó un valor de 1,8-2, momento en el que se añadieron 40 µl del detergente Silwett-L77 (OSi Specialties), que facilita la adhesión de las bacterias a las flores.

La infiltración de las plantas se realizó durante 1 min, por inmersión de sus partes aéreas en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* descrito anteriormente. Las plantas se mantuvieron durante 15 min sobre papeles de filtro, y después se enfundaron en bolsas de plástico transparente, y se transfirieron a una cámara de cultivo, en la que permanecerán hasta la recolección de las semillas. Un día después de la infiltración, las bolsas se cortaron por su parte superior para facilitar la aireación de las plantas. Además, se limitó su riego, procurando que el nivel de agua de subirrigación no superara los 2 cm de altura dentro de la cubeta, a fin de reducir la humedad en las macetas y minimizar el crecimiento de hongos.

IV.8.- Microfotografía y microscopía

Las fotografías de las plantas 14 o 21 dde, se tomaron con una lupa trinocular Nikon SMZ1500, con un dispositivo microfotográfico Nikon DS-Ri2, e iluminación anular de fibra óptica, provista por una fuente de luz fría Volpi Intralux 6000-1. Se llevó a cabo el análisis de la localización subcelular de la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando un microscopio confocal Stellaris de fluorescencia Leica DMRB. Para la adquisición de las imágenes se utilizó una cámara Nikon DXM 1200F acoplada al microscopio de fluorescencia.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Situación del trabajo al inicio del TFM

A mi llegada al laboratorio, el estudio de la localización subcelular de las proteínas PRH75, UTP18, RRP36 y POL5 se encontraba en el estado que se detalla en la Figura 4 (Vázquez Pagán, 2022). Mi trabajo ha consistido en el análisis de las plantas transformadas con las construcciones $PRH75_{pro}:PRH75:GFP$ y $UTP18_{pro}:UTP18:GFP$, finalizar la generación de las construcciones $RRP36_{pro}:RRP36:GFP$ y $POL5_{pro}:POL5:GFP$, obtener plantas portadoras de dichas construcciones y analizarlas, estableciendo si su expresión es capaz de rescatar el fenotipo de los mutantes afectados en los correspondientes genes, y la localización subcelular de las proteínas generadas.

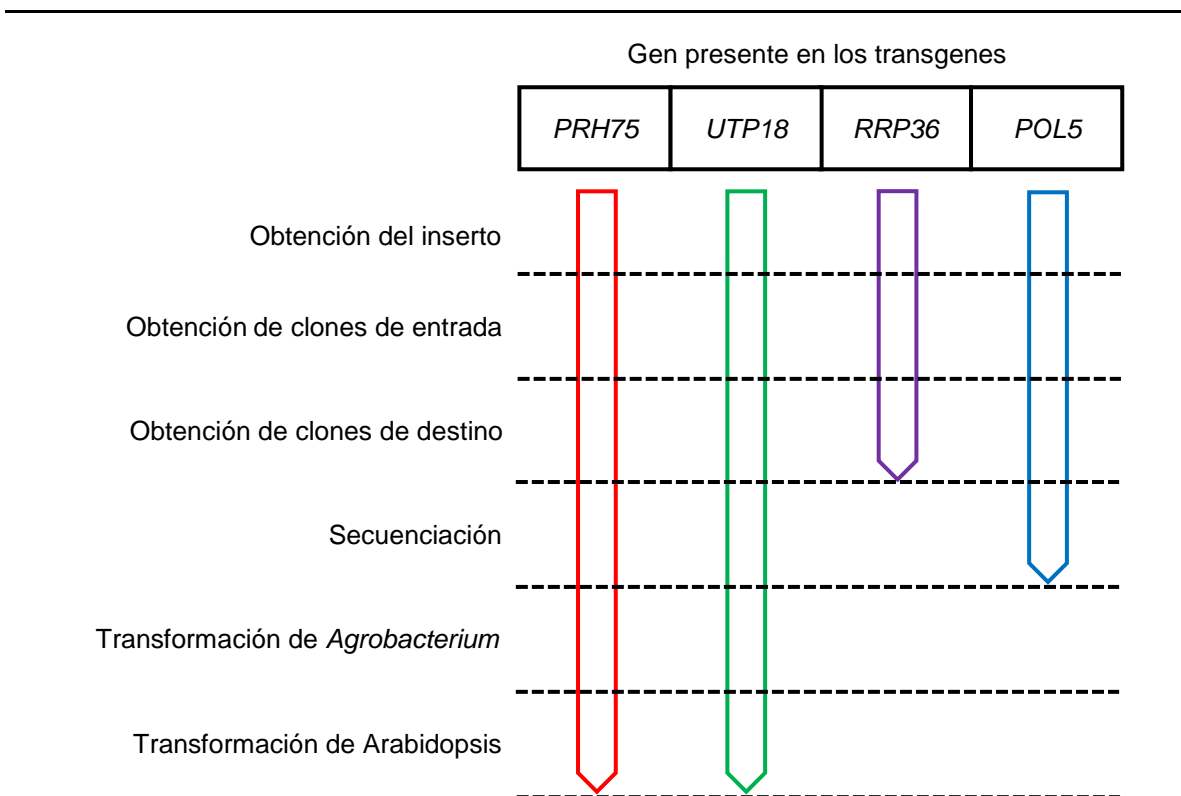


Figura 4.- Diagrama del proceso de construcción de los transgenes y su posterior transferencia a plantas de *Arabidopsis*. Las flechas indican el estado de cada construcción al inicio de este TFM. Tomado de Vázquez Pagán, 2022.

V.2.- Localización subcelular de las proteínas de fusión PRH75-GFP y UTP18-GFP

V.2.1.- Análisis de las plantas portadoras del transgén *PRH75_{pro}:PRH75:GFP*

V.2.1.1.- Aislamiento de plantas T₂ de Col-0 y *atrh7-2*

Las plantas *atrh7-2* son más pequeñas y presentan un retraso de 6 a 7 días en el momento de la floración, en comparación con las silvestres, su hojas son apuntadas y dentadas y sus raíces cortas y muy ramificadas (Huang *et al.*, 2016, Figura 5A, en la página 22). Estos resultados revelan que *PRH75 (ATRH7)* juega un papel en el desarrollo de las plantas, pero no es esencial, ya que el alelo *atrh7-2* es probablemente nulo al encontrarse el gen *PRH75* interrumpido por el ADN-T en su noveno exón, de los 13 que posee (Figura 4A, en la página 22).

Mi trabajo con el gen *PRH75* comenzó con la recolección de las semillas T₂ de dos plantas de Col-0 y tres de *atrh7-2*, portadoras del transgén *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* y su siembra en placas de Petri con medio de cultivo GM suplementado con higromicina (apartado IV.5.1 de la página 14). Perseguíamos así determinar la segregación del transgén y analizar el fenotipo de las plantas transformadas.

La segregación de plantas resistentes y sensibles al antibiótico en la T₂ permite determinar si el transgén se encuentra en una o más copias en el genoma de un individuo T₁ seleccionado por su resistencia al antibiótico, que deben estar en heterocigosis en esa primera generación. Al ser la resistencia al antibiótico un rasgo dominante, una proporción 3:1 de individuos resistentes frente a sensibles en la generación T₂, indicaría la presencia de una única inserción en el genoma de la planta T₁, y de dos copias si fuese una 15:1.

Se realizaron ensayos de significación basados en el estadístico chi-cuadrado (χ^2). Así, se aplicaron ensayos de bondad de ajuste, expresando el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis nula de que los datos observados se ajustaban a la segregación propuesta. El valor por encima del cual se consideró rechazable la hipótesis nula fue el correspondiente a un nivel de significación del 95%, es decir $\chi^2_{0,95} = 3,84$, con un grado de libertad (GL).

Establecimos que tres de las líneas T₂ se ajustaban a una segregación 3:1 y una a la 15:1. Además, se identificó una línea cuya segregación no se correspondía con ninguna de las dos proporciones ensayadas (Tabla 3, en la página 22). Se decidió continuar con aquellas que sólo presentaban una inserción.

Tabla 3.- Estudio del modo de herencia del transgén *PRH75_{pro}:PRH75:GFP*

Fondo genético	Línea	Plantas Hig ^R	Plantas Hig ^S	χ^2 (3:1)	χ^2 (15:1)
Col-0	1	56	21	0,21	58,08
	2	64	16	1,07	25,81
<i>atr7-2</i>	1	62	16	0,84	27,08
	2	62	7	8,12	1,79
	3	64	10	5,21	6,66

Los valores de χ^2 indican el grado de ajuste de los datos de la población estudiada a una segregación fenotípica esperada 3:1 y 15:1. En negrita se presentan los valores que permiten aceptar la hipótesis, para un valor de $P < 0,05$.

Las plantas transgénicas Col-0 fueron como las silvestres, mientras que las de fondo mutante tuvieron un fenotipo intermedio ya que sus las hojas eran apuntadas y dentadas, como en el mutante *atr7-2*, mientras que el tamaño de la roseta fue muy similar al de Col-0 (Figura 5B-E). Concluimos que el transgén *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* rescata parcialmente el fenotipo de las plantas homocigóticas *atr7-2*.

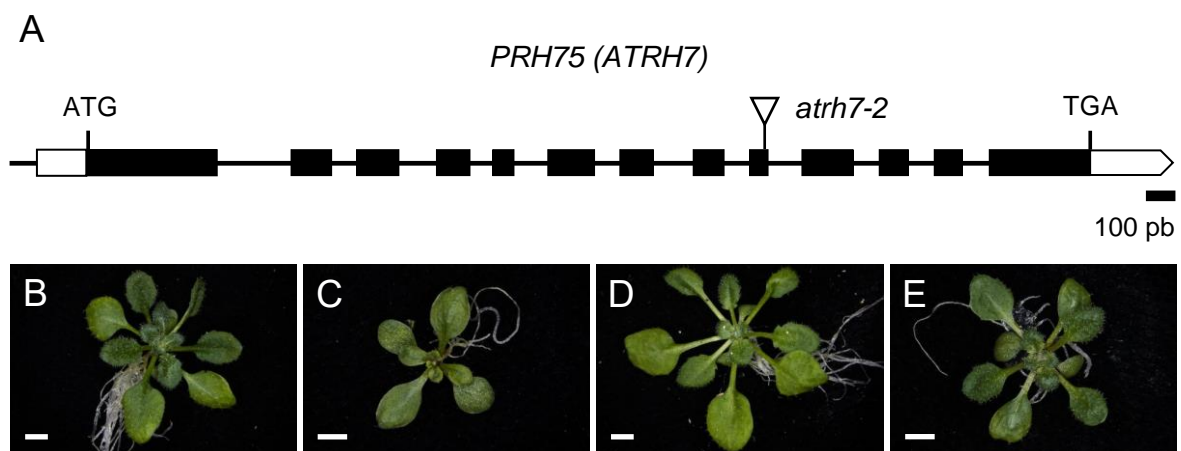


Figura 5.- Estructura del gen *PRH75 (ATR7)* y efecto de la expresión del transgén *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* en el mutante *atr7-2*. (A) Estructura del gen *PRH75 (ATR7)*, con indicación del sitio de la inserción *atr7-2*, con un triángulo invertido. Los rectángulos representan los exones, y las líneas que los separan, los intrones. Se representan en blanco el líder (5'-UTR) y el tráiler (3'-UTR). (B-E) Fenotipo foliar de plantas (B) Col-0, (C) *atr7-2*, (D) Col-0 *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* y (E) *atr7-2 PRH75_{pro}:PRH75:GFP*. Las fotografías se tomaron de plantas 21 dde. Las barras de escala indican 3 mm.

V.2.1.2.- Determinación de la localización subcelular de PRH75

Se analizó la fluorescencia de la GFP, iluminado con un microscopio confocal las raíces de plántulas T₂ 5 dde, portadoras de la construcción *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* en fondo

Col-0. Se empleó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) como agente de tinción, ya que se une al ADN y marca el nucleoplasma al contener el genoma, pero excluye el nucleolo que contiene mayoritariamente ARN y su contenido en ADN es muy escaso (véase el apartado II.1.3, en la página 5).

Se encontró el mayor nivel de fluorescencia en las células del ápice de la raíz principal (Figura 6A-C), y dentro de las células principalmente en el núcleo, aunque también en el citoplasma, donde la señal fluorescente fue mucho más débil (Figura 6D-F). La fluorescencia proporcionada por el DAPI nos permitió determinar que la proteína de fusión PRH75-GFP se localiza predominantemente en el nucleolo, en donde su distribución no parece homogénea, ya que se observan zonas con mayor intensidad de fluorescencia emitida por la GFP, lo que sugiere que la proteína se acumula en áreas específicas, pero que son difíciles de determinar con este nivel de resolución (Figura 6D-F).

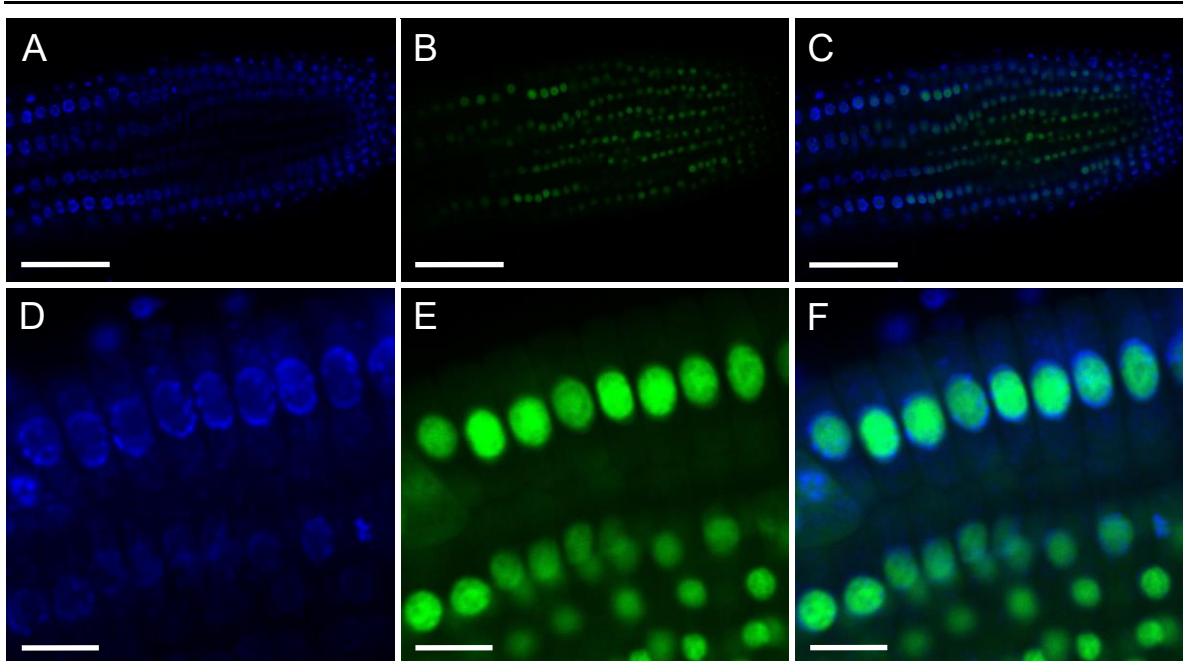


Figura 6.- Expresión del transgén *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* en células de la raíz de Col-0. En las imágenes se destaca (A, D) el núcleo, marcado con DAPI, (B, E) la proteína de fusión PRH75-GFP mediante la emisión fluorescente de la GFP, en el nucleolo y excluida del núcleo y (C, F) su superposición. Las micrografías se tomaron de plantas 5 dde. Las barras de escala indican (A-C) 60 y (D-F) 10 μ m.

V.2.2.- Análisis de las plantas portadoras del transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*

V.2.2.1.- Aislamiento de plantas T₂

Antes del inicio de este TFM se caracterizó en el laboratorio la línea insercional GK-865A05 que interrumpe el gen *UTP18* (AT5G14050) en su segundo exón (Martínez Fenoll,

2022; Figura 7A, en la página 25). Se determinó que las plantas homocigotas *utp18-1* eran letales gametofíticas. Por ello, se transformaron plantas de Col-0 y *UTP18/utp18-1* con el transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* con el fin de determinar la localización subcelular de la proteína UTP18 y si el transgén era capaz de rescatar el fenotipo letal del mutante homocigótico *utp18-1*.

Mi trabajo comenzó con la recolección y siembra de las semillas T₂ de tres plantas T₁ de Col-0 y una de *UTP18/utp18-1*, portadoras de la construcción *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*. Se procedió a sembrar las semillas con y sin higromicina, y a establecer las segregaciones, tal como se detalla en el apartado IV.5.1 de la página 14. Encontramos en dos de las líneas T₂ que la proporción de plantas resistentes frente a mutantes se ajustaban a una segregación 3:1, revelando la presencia del transgén en una copia en el genoma de la planta T₁. En las otras dos, la segregación se ajustó a una 15:1, lo que indicaba la existencia de dos copias por genoma (Tabla 4).

Tabla 4.- Estudio del modo de herencia del transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*

Fondo genético	Línea	Plantas Hig ^R	Plantas Hig ^S	χ^2 (3:1)	χ^2 (15:1)
Col-0	1	39	15	0,22	42,71
	2	44	6	4,51	2,82
	3	39	5	4,36	1,96
<i>UTP18/utp18-1</i>	1	39	17	0,27	48,66

Los valores de χ^2 indican el grado de ajuste de los datos de la población estudiada a una segregación fenotípica esperada 3:1 y 15:1. En negrita se presentan los valores que permiten aceptar la hipótesis, para un valor de $P < 0,05$.

Observamos plantas en las placas suplementadas con antibiótico que presentaban también hojas apuntadas y dentadas (Figura 7, en la página 25). Como esperábamos, ni la presencia del transgén ni la higromicina modificaron el fenotipo de las plantas Col-0 (Figura 7, en la página 25). Para determinar si las plantas que presentaban fenotipo mutante eran, además de portadoras del transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*, homocigotas para *utp18-1*, amplificamos el alelo silvestre y el mutante mediante PCR empleando los cebadores GK-865A05-LP, GK-865A05-RP y LB_o8474 (Tabla 2, en la página 17; Figura 7, en la página 25). Cuatro de las 26 plantas presentaron fenotipo mutante y fueron homocigotas para la mutación *utp18-1*. Este resultado sugiere que el transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* rescata la letalidad asociada a la homocigosis del alelo *utp18-1*, pero que no suple en su totalidad la función del alelo silvestre *UTP18*. Sin embargo, la obtención de un fenotipo viable y

relativamente suave a nivel morfológico, permitirá estudiar el efecto de la pérdida de función de *UTP18*, que no podemos establecer usando los mutantes nulos, al ser letales.

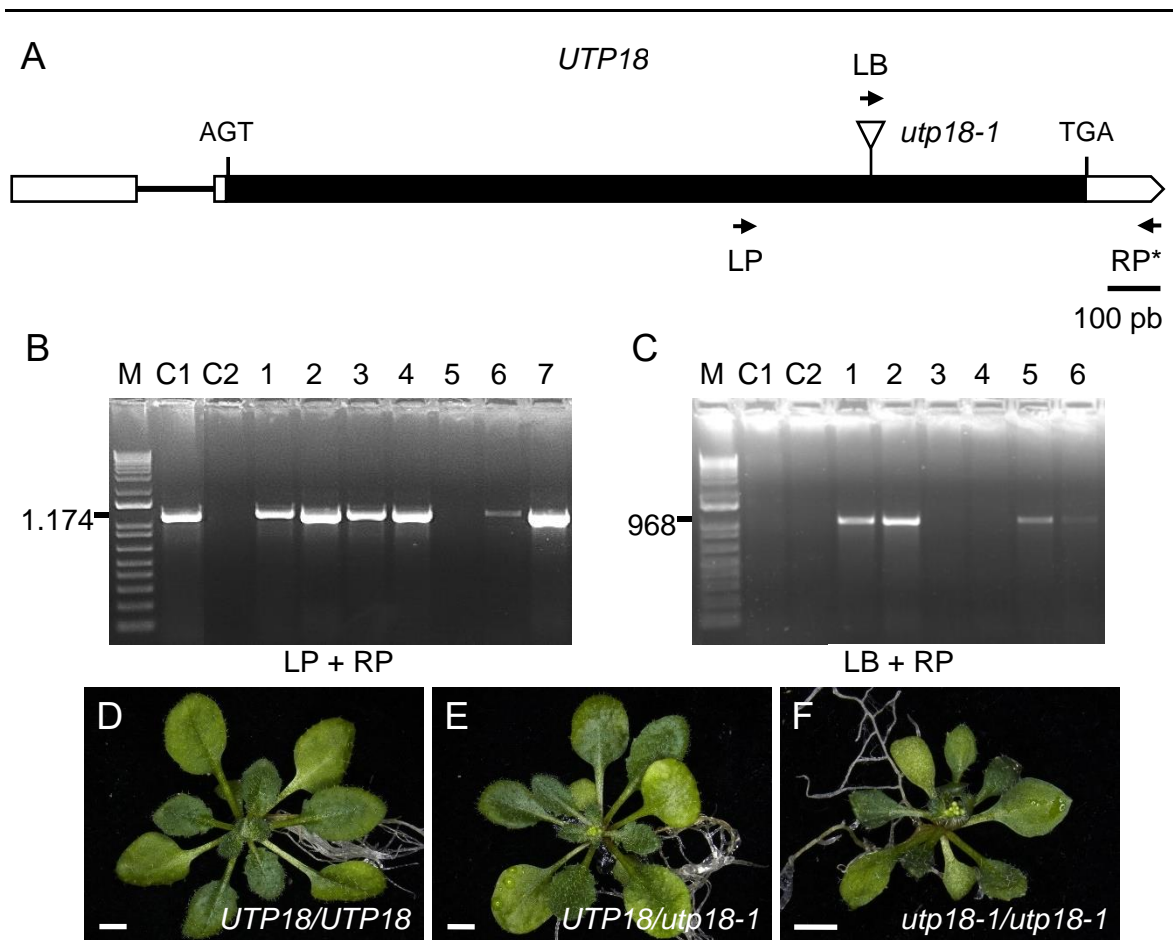


Figura 7.- Estructura de *UTP18*, caracterización fenotípica y genotipado de plantas portadoras de la construcción *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*. (A) Estructura del gen *UTP18*, con indicación del sitio de la inserción de *utp18-1*, con un triángulo invertido. LP: GK-865A05-LP. RP*: GK-865A05-RP, el asterisco indica que la región complementaria a este cebador está aguas abajo de la unidad de transcripción. LB: LB_o8474. (B, C) Genotipado de las plantas transformadas. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 6, en la página 23. M: marcador de peso molecular. C1: control con el ADN genómico de una planta *Arabidopsis* homocigota silvestre. C2: control con agua. Se indican los cebadores empleados, y el tamaño en pb de los productos de PCR obtenidos. (D-F) Fenotipo foliar de plantas (D) *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* en fondo Col-0, (E) *UTP18/utp18-1* y (F) *utp18-1/utp18-1*. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala indican 3 mm.

V.2.2.2.- Determinación de la localización subcelular de *UTP18*

Se analizó la fluorescencia de la GFP en raíces de plántulas T₂ portadoras de la construcción *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*, siguiendo el mismo procedimiento que con la proteína PRH75-GFP (apartado V.2.1.2, en la página 22). La expresión de la GFP fue mayor en el ápice de la raíz que en la zona intermedia (Figura 8), donde la señal fluorescente fue débil,

como habíamos observado con la proteína quimérica PRH75-GFP (Figura 6, en la página 23). La fluorescencia de la proteína UTP18-GFP también se localizó en el nucleolo, donde su distribución fue difusa y homogénea, a diferencia de la de PRH75 (Figura 6, en la página 23). Sin embargo, se acumulaba en regiones específicas en el citoplasma, lo que podría indicar la presencia de la proteína en ribosomas, o que UTP18 tiene un papel adicional al de formar parte del procesoma SSU (Figura 8).

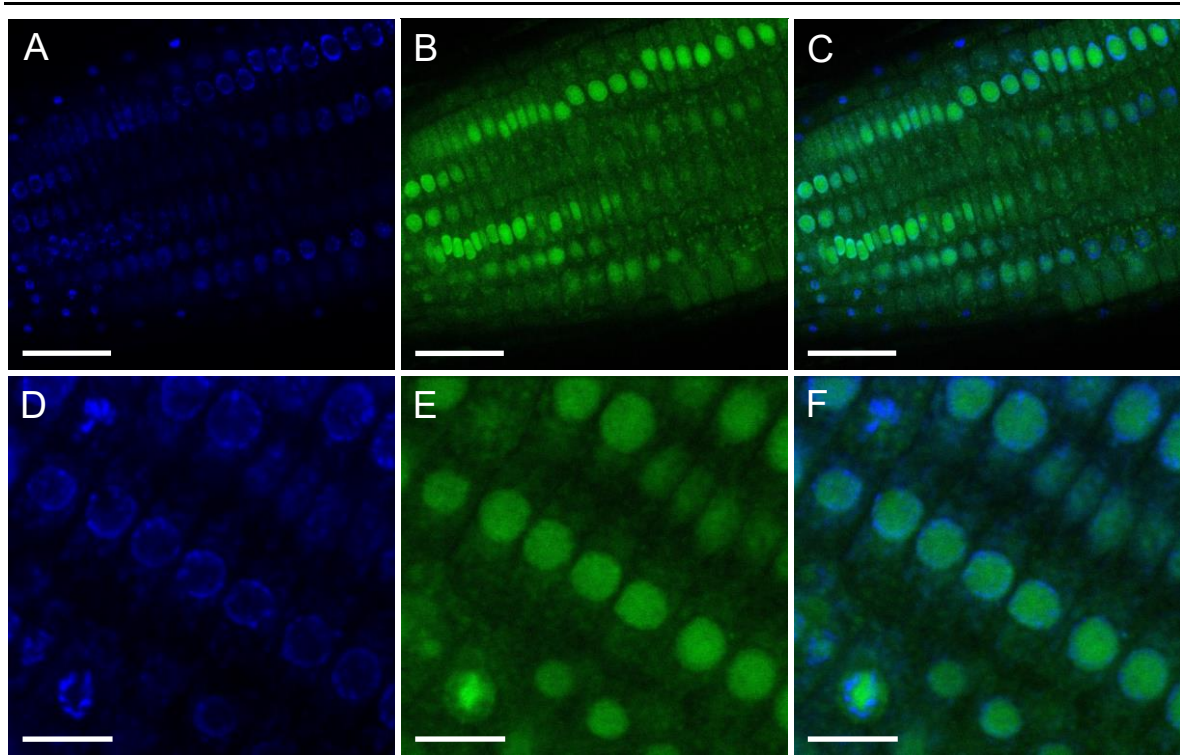


Figura 8.- Expresión del transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* en células de raíz de Col-0. Se muestran imágenes (A, D) del ADN marcado con DAPI, (B, E) de la proteína de fusión UTP18-GFP mediante la emisión fluorescente de la GFP y (C, F) su superposición. Las micrográficas se tomaron de plantas T₁ 5 dde. Las barras de escala indican 30 μ m (A-C) y 10 μ m (D-F).

V.3.- Localización subcelular de las proteínas de fusión RRP36-GFP y de POL5-GFP

En el laboratorio, se habían obtenido colonias de la estirpe DH5 α de *Escherichia coli* presuntamente portadoras del clon de destino, con el inserto *RRP36_{pro}:RRP36*, que carecía del codón de terminación de la traducción para que se hiciera posible la fusión traduccional de la proteína de interés y la GFP, cuyo gen se encuentra en el vector de destino pMDC107. Mi trabajo con esta construcción consistió en continuar esta parte del trabajo, para lo cual debí genotipar las colonias transformadas, obtener su ADN plasmídico, comprobar mediante secuenciación la integridad de la construcción y que el ARNm quimérico se

encontraría en fase para la generación de la proteína de fusión, y transferir el clon de destino a *Agrobacterium tumefaciens*, infiltrar *Arabidopsis*, seleccionar plantas transformantes T₁ y establecer la localización subcelular de RRP36.

Por otro lado, se habían obtenido y secuenciado dos clones de destino con el transgén *POL5_{pro}:POL5:GFP*. Mi trabajo consistió en la transferencia del clon de destino a *Agrobacterium tumefaciens*, infiltrar *Arabidopsis*, seleccionar plantas transformantes T₁ y establecer la localización subcelular de POL5.

V.3.1.- Secuenciación del transgén *RRP36_{pro}:RRP36:GFP*

Se tomó masa bacteriana de las colonias positivas y se comprobó mediante amplificación por PCR con los cebadores RRP36p:RRP36:GFP_F2 y RRP36p:RRP36:GFP_R2 (Figura 9A) la presencia del transgén. Todas las colonias genotipadas generaron un producto de amplificación del tamaño esperado (Figura 9B).

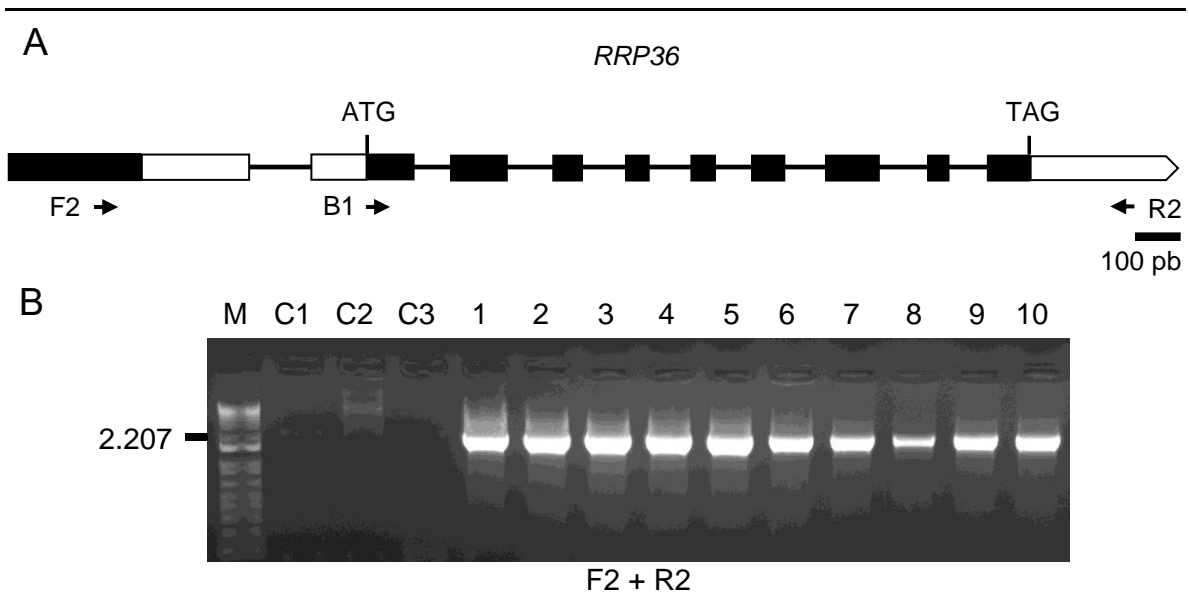


Figura 9.- Estructura de *RRP36* y genotipado de las bacterias de *Escherichia coli* portadoras de la construcción *RRP36_{pro}:RRP36:GFP*. (A) Estructura del gen *RRP36*. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 6, en la página 23. (B) Genotipado de diez colonias de *Escherichia coli*. Los cebadores utilizados fueron RRP36p:RRP36:GFP_F2 y RRP36p:RRP36:GFP_R2. M: marcador de peso molecular. C1: control con ADN plasmídico del clon de destino. C2: control con ADN plasmídico del vector vacío. C3: control con agua. Se indican los cebadores empleados, y el tamaño en pb de los productos de PCR obtenidos.

Se seleccionaron dos colonias positivas, que sirvieron para iniciar un cultivo de 3 ml de medio LB suplementado con kanamicina, el marcador selectivo en bacterias. Se purificó el ADN plasmídico de las bacterias portadoras del transgén *RRP36_{pro}:RRP36:GFP*, como

se detalla en el apartado IV.6.1.2 de la página 17, para su secuenciación por el método de Sanger. Se emplearon los cebadores M13F, M13R y GFP_Rev que hibridan en el vector y que flanquean el inserto, además de los cebadores RRP36p:RRP36:GFP R2 y attB1-RRP36, que hibridan dentro del inserto (Figura 9A, en la página 27). El análisis de los electroferogramas resultantes de la secuenciación permitió comprobar la integridad del transgén y que la región codificante del gen *RRP36* y el ADNc de la GFP se encontraban en la misma fase de lectura, para que la traducción del ARNm quimérico generase la proteína de fusión RRP36-GFP (Figura 10).



Figura 10.- Secuencia parcial del clon de destino portador del transgén *RRP36_{pro}::RRP36:GFP*. Secuencia nucleotídica, traducción a proteína y electroferograma de la fusión traduccional RRP36-GFP. Se muestran los tres últimos codones codificantes del gen *RRP36* (sin el codón de terminación; en azul), la secuencia espaciadora que se encuentra en el vector de destino (en morado) y los primeros cuatro codones del gen de la *GFP* (en verde). Debajo de las secuencias de nucleótidos se muestran la traducción a proteína de las tres regiones, cuyo análisis permitió establecer que *RRP36* y el gen de la *GFP* están en fase.

V.3.2.- Transferencia de los transgenes a *Agrobacterium tumefaciens* y *Arabidopsis*

Se transformaron mediante electroporación células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 electrocompetentes con 20 ng del ADN plasmídico procedente de los clones de destino confirmados por secuenciación, tal como se describe en el apartado IV.7.1, en la página 18. A continuación, se inocularon las bacterias electroporadas en placas de Petri con medio de cultivo LB suplementado con kanamicina y rifampicina, para la selección positiva de los transformantes. Las inoculaciones se realizaron tal como se describe en el apartado IV.4, en la página 13. Las placas se incubaron durante 48 h a 28°C.

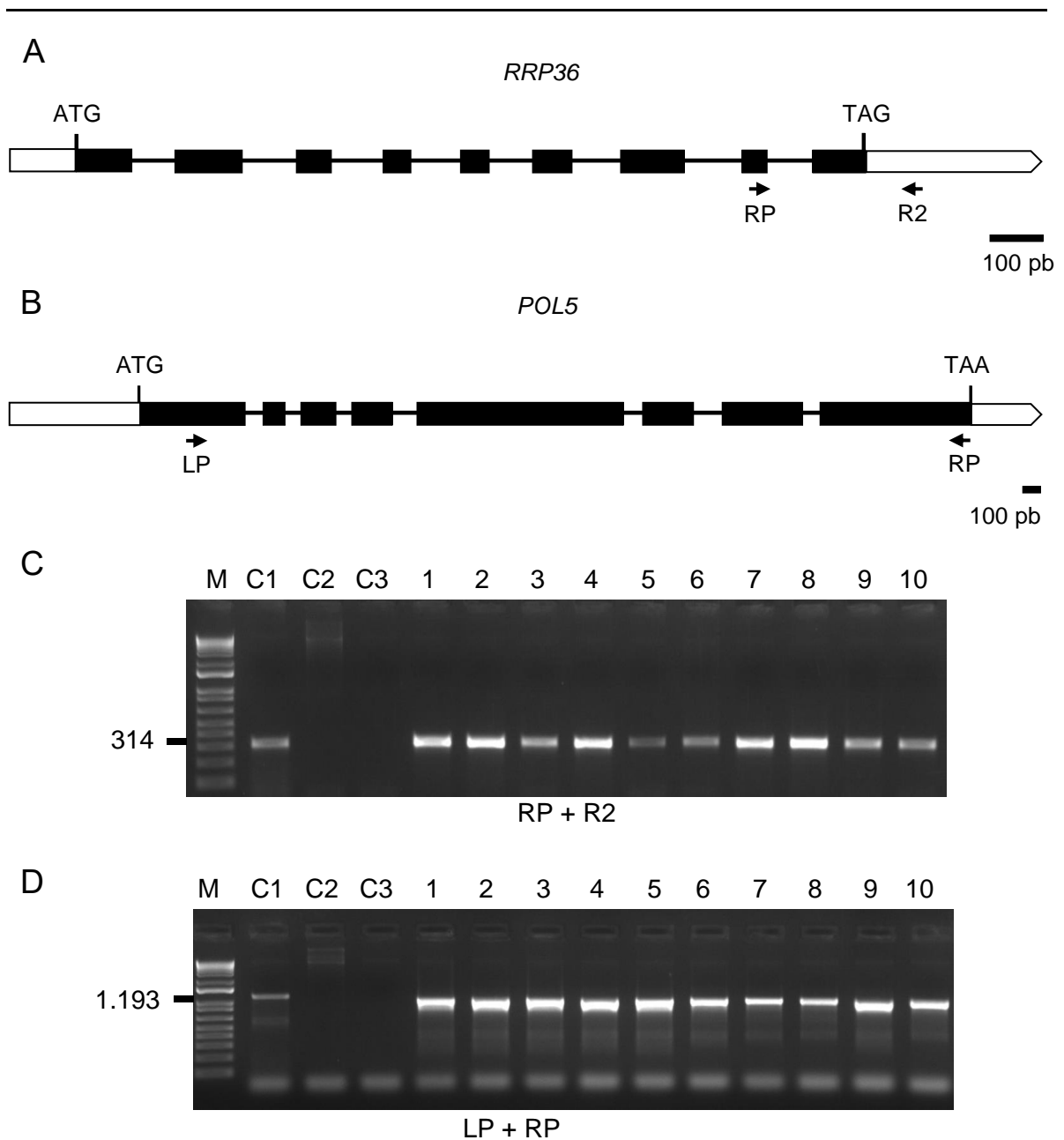


Figura 11.- Estructura de *RRP36* y *POL5*, y genotipado de *Agrobacterium tumefaciens*. Estructura de los genes (A) *RRP36* y (B) *POL5*. (C, D) Genotipado de colonias de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen los vectores de destino con las construcciones (C) *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* y (D) *POL5_{pro}:POL5:GFP*. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 6, en la página 23. M: marcador de peso molecular. C1: control con ADN plasmídico del clon de entrada. C2: control con ADN plasmídico del vector vacío. C3: control con agua. Se indican los cebadores empleados, y el tamaño en pb de los productos de PCR obtenidos.

Se verificó la presencia de la construcción en las bacterias mediante PCR, utilizando los cebadores SALK-116493_RP y RRP36p:RRP36:GFP R2 para *RRP36*, y SALK-043817 LP y SALK-043817 RP para *POL5*. Se empleó como control positivo de las amplificaciones

el ADN plasmídico del clon de entrada (C1; Figura 11C, en la página 29) y como controles negativos el del vector de destino sin la construcción (C2) y agua (C3). Se observó la banda esperada en las bacterias transformadas, lo que indicaba la presencia del clon de destino (Figura 11, en la página 29).

Finalmente, se llevó a cabo la transformación de *Arabidopsis* con las construcciones de interés. En un TFG previo se estudió la línea GT_3_270 (*pol5-1*, en fondo *Ler*), portadora de la inserción de un transposón en el líder del gen *POL5*, cuya homocigosis producía letalidad embrionaria (Martínez Fenoll, 2022). Además, se analizó la línea SALK_026222C (*rrp36-1*), portadora de una inserción de ADN-T en el tráiler del gen *RRP36* y cuyo fenotipo era silvestre. Se concluyó que como la inserción de ADN-T no daña la región codificante del gen, probablemente tampoco altera su expresión, lo que explicaría el fenotipo silvestre de las plantas *rrp36-1* homocigóticas. Por todo ello, decidimos transformar plantas *POL5/pol5-1* y *Ler* con el clon de destino portador del transgén *POL5_{pro}:POL5:GFP* y *Col-0* y *Ler* con *RRP36_{pro}:RRP36:GFP*, pero no el mutante *rrp36-1*.

Para ello, se partió de una colonia transformante de cada construcción, que sirvió para iniciar un cultivo en medio LB líquido suplementado con kanamicina y rifampicina (apartado IV.5.2, en la página 15). Con estos cultivos se transformaron plantas de *Arabidopsis*, de las estirpes silvestre *Col-0* y *Ler*, y de plantas *POL5/pol5-1* mediante infección por infiltración, tal como se describe en el apartado IV.7.2, en la página 19. Se infiltraron tres macetas (aproximadamente 20 plantas por maceta) por construcción. Las plantas infiltradas (T_0) se dejaron secar y se recolectaron sus semillas T_1 .

V.3.3.- Obtención de transformantes *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* y *POL5_{pro}:POL5:GFP*

Se sembraron las semillas T_1 en masa, a razón de unas 5.000 semilla en cada placa de Petri con medio de cultivo GM suplementado con higromicina (apartado IV.5.1, en la página 14). Se obtuvieron 94 plantas T_1 resistentes al antibiótico y que debían ser portadoras del transgén *RRP36_{pro}:RRP36:GFP*, cuatro de ellas de la transformación de *Col-0*, y 90 de *Ler*, cuyo crecimiento similar a la de una planta silvestre en medio sin antibiótico, fue fácilmente distinguible de las sensibles, 10 días después de la siembra (Figura 12A, en la página 31). Por otro lado, se obtuvieron siete plantas T_1 resistentes a higromicina y que debían ser portadoras del transgén *POL5_{pro}:POL5:GFP*, descendientes de plantas *POL5/pol5-1* que se sometieron a infiltración (Figura 12B, en la página 31).

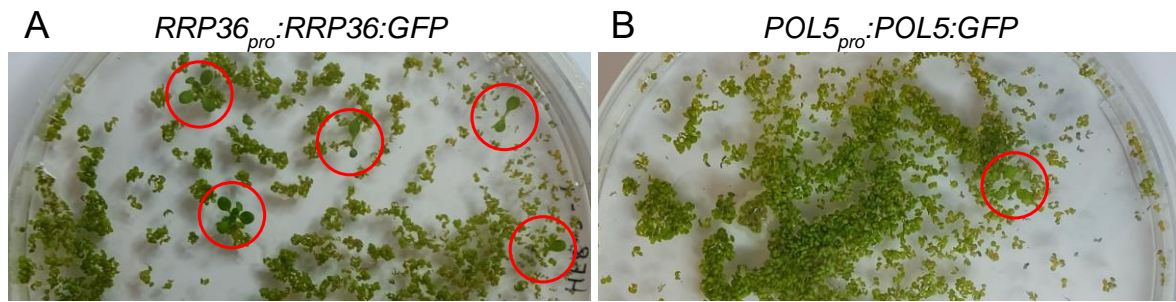


Figura 12.- Selección de transformantes T₁ portadores de las construcciones de interés. Se muestran dos placas con algún transformante resistente a higromicina (círculos rojos) presuntamente portadores de las construcciones (A) *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* y (B) *POL5_{pro}:POL5:GFP*.

Con el fin de identificar las plantas homocigóticas *pol5-1* y portadoras del transgén, se amplificó el ADN de las plantas T₁ mediante PCR, con los cebadores GT_3_7280 LP, GT_3_7280 RP y DS3-1 (Figura 13A). Se identificaron así cinco plantas *POL5/POL5* y dos *POL5/pol5-1*, cuyos fenotipos fueron silvestres, que era lo esperado (Figura 13B y C). Debido a que no obtuvimos ningún homocigoto mutante para *pol5-1*, se decidió analizar la siguiente generación (T₂) de una de las plantas heterocigóticas.

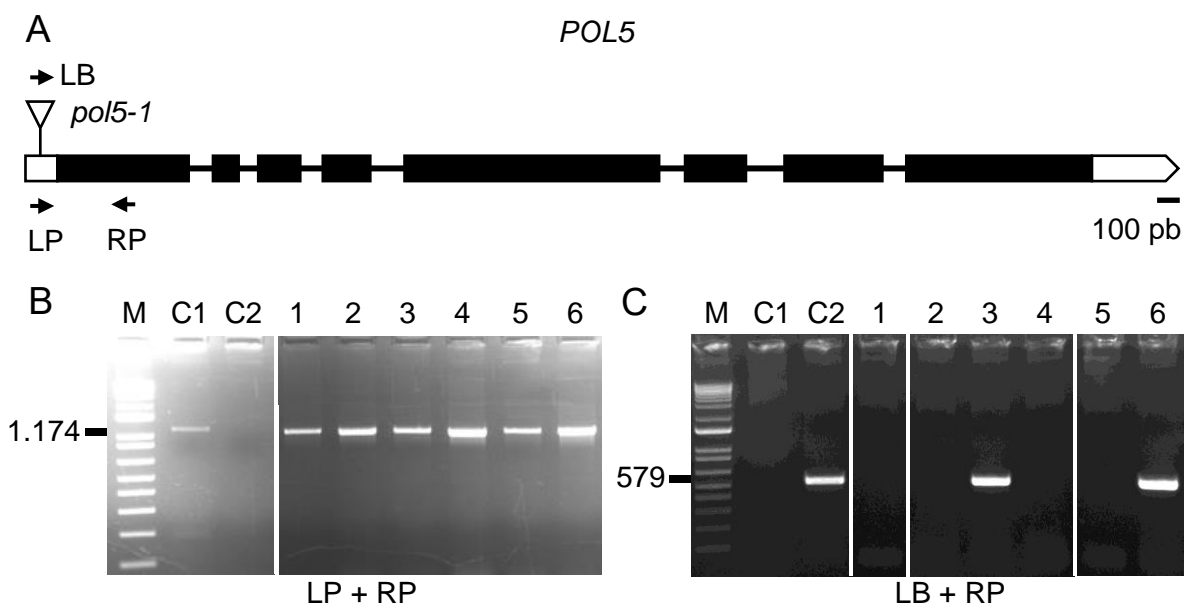


Figura 13.- Estructura de *POL5* y genotipado de las plantas portadoras de la construcción *POL5_{pro}:POL5:GFP*. (A) Estructura del gen *POL5*, con indicación del sitio de la inserción de *pol5-1*, con un triángulo invertido. (B, C) Genotipado de las plantas transformadas. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 5, en la página 22. LP: GT_3_7280 LP. RP: GT_3_7280 RP. LB: DS3-1. M: marcador de peso molecular. C1: control con el ADN genómico de una planta *Arabidopsis* homocigota silvestre. C2: control con el ADN genómico de una planta *Arabidopsis* homocigota mutante *pol5-1*. C3: control con agua. Se indican los cebadores empleados, y el tamaño en pb de los productos de PCR obtenidos.

V.3.4.- Análisis de las plantas T₂ portadoras de las construcciones *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* y *POL5_{pro}:POL5:GFP*

Se sembraron las semillas T₂ procedentes del individuo *POL5/pol5-1* *POL5_{pro}:POL5:GFP* en placas de Petri con medio de cultivo MG suplementado con higromicina. Se genotiparon cuatro plantas que presentaban un fenotipo mutante (Figura 14). Dos de ellas resultaron ser *POL5/pol5-1* y las otras dos *pol5-1/pol5-1*. Pudimos concluir así que el transgén *POL5_{pro}:POL5:GFP* rescataba parcialmente el fenotipo de *pol5-1*.

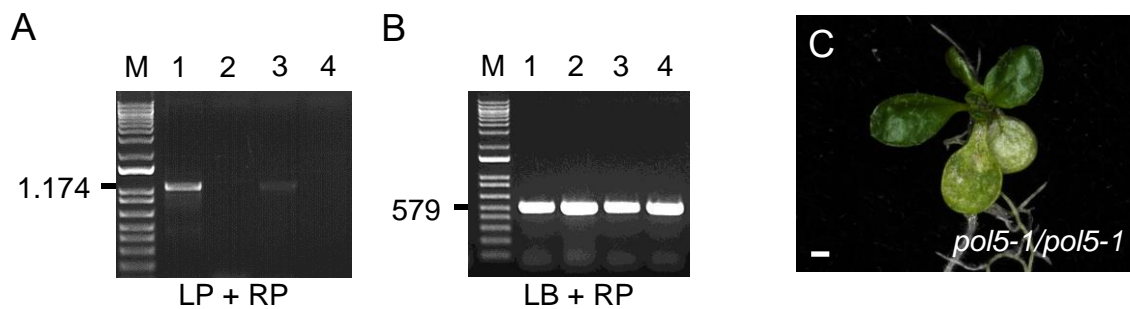


Figura 14.- Genotipado de las plantas T₂ portadoras de la construcción *POL5_{pro}:POL5:GFP*. (A, B) Genotipado de las plantas transformadas que presentaban fenotipo. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 5, en la página 22. M: marcador de peso molecular. Se indican los cebadores empleados (ilustrados en la Figura 13), y el tamaño en pb de los productos de PCR obtenidos. (C) Fenotipo foliar de una planta *POL5_{pro}:POL5:GFP* en fondo *pol5-1/pol5-1*. Las fotografías se tomaron 14 dde. Las barras de escala indican 1 mm.

V.3.5.- Determinación de la localización subcelular de RRP36 y POL5

Se analizó la fluorescencia de la GFP en raíces de plántulas T₂ con las construcciones *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* y *POL5_{pro}:POL5:GFP*, siguiendo el mismo procedimiento que con las proteínas anteriores. En ambos casos la expresión de la GFP fue mayor en el ápice de la raíz (Figura 15, en la página 33), como se observó con las proteínas de fusión PRH75-GFP (Figura 6, en la página 23) y UTP18-GFP (Figura 8, en la página 26). La localización subcelular de RRP36-GFP fue muy similar a la de PRH75 (Figura 6, en la página 23), siendo mayor la intensidad de la fluorescencia en el nucleolo que en el citoplasma, pero distribuyéndose en ambos de forma homogénea (Figura 15, en la página 33). La GFP de la fusión con POL5 se acumulaba en regiones específicas del nucleolo (Figura 16), como es el caso de PRH75 (Figura 6, en la página 23), que podrían corresponder con dominios funcionales.

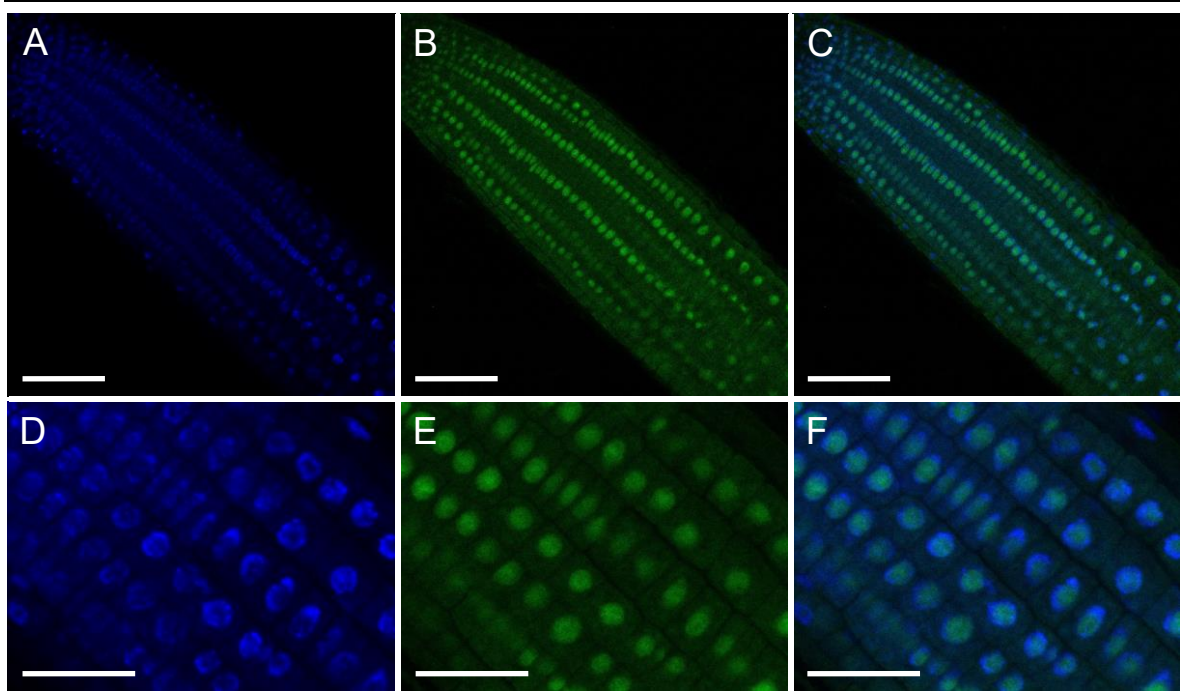


Figura 15.- Expresión del transgén *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* en células de raíz de Col-0. Se muestran imágenes (A, D) del ADN marcado con DAPI, (B y E) de la proteína de fusión RRP36-GFP mediante la emisión fluorescente de la GFP y (C y F) su superposición. Las micrografías se tomaron de plantas T₁ 5 dde. Las barras de escala indican (A-C) 60 μ m y (D-F) 30 μ m.

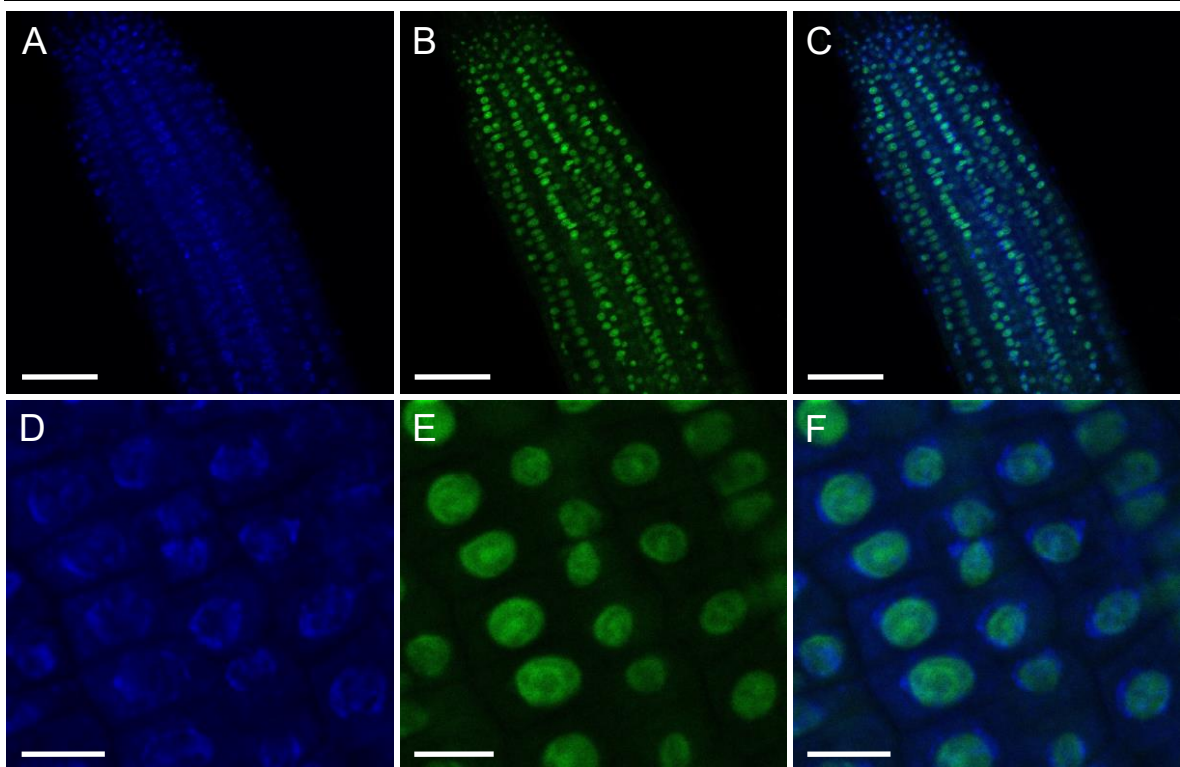


Figura 16.- Expresión del transgén *POL5_{pro}:POL5:GFP* en células de raíz de Col-0. Se muestran imágenes (A, D) del ADN marcado con DAPI, (B y E) de la proteína de fusión RRP36-GFP mediante la emisión fluorescente de la GFP y (C y F) su superposición. Las micrografías se tomaron de plantas T₁ 5 dde. Las barras de escala indican (A-C) 50 μ m y (D-F) 10 μ m

V.4.- Predicciones de la localización de PRH75, RRP36, POL5 y UTP18

Existen múltiples programas bioinformáticos que predicen la localización subcelular de proteínas en base a su secuencia de aminoácidos y que utilizan diversos algoritmos, los más recientes basados en inteligencia artificial. Para determinar si nuestros resultados de localización subcelular coincidían con sus predicciones, se realizaron análisis *in silico* con cinco programas que utilizan diferentes algoritmos: BaCelLo (Pierleoni *et al.*, 2006), MultiLoc2 (Blum *et al.*, 2009), WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007) e YLoc (Briesemeister *et al.*, 2010) (Tabla 5). Decidimos llevar a cabo también un análisis de la localización de la proteína a nivel suborgánular, con el predictor MuLocDeep (Jiang *et al.*, 2021).

Tabla 5.- Predicciones sobre la localización subcelular de las proteínas de interés

Predictor	PRH75	UTP18	RRP36	POL5
BaCelLo	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo
MultiLoc2	Núcleo	Citoplasma y núcleo Núcleo	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma
WoLF PSORT	Núcleo	Citoplasma, núcleo, núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma
YLoc	Citoplasma	Núcleo	Núcleo	Núcleo
MuLocDeep	Nucleolo	Nucleolo, agregados nucleares (<i>speckles</i>)	Nucleolo	Nucleolo, nucleoplasma, membrana nuclear

Aunque hubo algunas discrepancias entre los distintos predictores utilizados, la mayoría de ellos coincidió en que todas las proteínas eran nucleares (Tabla 5), lo que coincide con nuestros resultados experimentales (Figura 6, en la página 23; Figura 8, en la página 26; Figura 15, en la página 33; Figura 16, en la página 33). En el caso de PRH75, todos los predictores coinciden en que su localización es nuclear, excepto YLoc, que predice una ubicación citoplasmática, pero con baja probabilidad. UTP18 es la proteína que parece ser nuclear y citoplasmática con mayor probabilidad. Nuestros datos experimentales coinciden con lo predicho, ya que es la única de las proteínas cuya señal de la GFP se observa en el citoplasma, formando agregados cuya naturaleza sería interesante determinar para comprender en profundidad su función (Figura 8, en la página 26). RRP36 y POL5 tienen una predicción muy similar, hecho que concuerda con lo observado también experimentalmente. Podríamos concluir que se localizan principalmente en el núcleo y en mucha menor medida en el citoplasma.

Tal como constatamos mediante microscopía confocal, MuLocDeep predice una localización nucleolar para todas las proteínas. En el caso de UTP18, la predicción incluye su presencia en agregados nucleares (*nuclear speckles*), aunque nuestra proteína UTP18-GFP no parece localizarse en estas estructuras del núcleo cuya función es la maduración del ARNm, incluyendo la regulación del *splicing*, y su exportación al citoplasma. La predicción de la localización de POL5 es, además del nucleolo, el nucleoplasma y la membrana nuclear, hecho que no concuerda con nuestros resultados ya que vemos que el DAPI rodea a la GFP (Figura 16, en la página 33), por lo que estaría excluido del nucleoplasma y de la membrana nuclear. Nuestros resultados son fiables, ya que la proteína quimérica POL5-GFP es completamente funcional y complementa la ausencia de la POL5 endógena, como revela su capacidad de rescatar completamente el fenotipo de las plantas *pol5-1/pol5-1*.

La mayor concentración de la fluorescencia de la GFP en el nucleolo en todas las proteínas que hemos estudiado, es congruente con que participen en la biogénesis del ribosoma. Se requieren estudios adicionales que ayuden a comprender mejor los mecanismos y funciones específicas de estas proteínas en el contexto del nucleolo y su relevancia biológica.

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

El objetivo principal de este TFM ha sido contribuir al análisis funcional de los genes *POL5*, *UTP18*, *PRH75* y *RRP36* de *Arabidopsis*. Para ello, hemos obtenido o analizado líneas transgénicas que han permitido establecer la localización subcelular de sus productos proteicos y rescatar el fenotipo de algunos mutantes de insuficiencia de función para dichos genes. Este TFM es la continuación de un TFG previo cuyo objetivo fue la generación de las construcciones *POL5_{pro}:POL5:GFP*, *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*, *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* y *RRP36_{pro}:RRP36:GFP*. No todos los transgenes tuvieron la misma dificultad para su obtención y clonación por lo que en este TFM se partía del clon de destino en *Escherichia coli* para las construcciones *POL5_{pro}:POL5:GFP* y *RRP36_{pro}:RRP36:GFP*, ya que no se había conseguido finalizar la obtención de transgenes y la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y de *Arabidopsis*, y de plantas T₂ portadoras de los transgenes *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* y *PRH75_{pro}:PRH75:GFP*.

En el caso de *PRH75*, hemos concluido que la expresión del transgén *PRH75_{pro}:PRH75:GFP* en el genoma de plantas *atrh7-2* rescata parcialmente el fenotipo característico de estos mutantes. La proteína *PRH75-GFP* se localiza predominantemente en ciertas áreas del nucleolo, aunque también se aprecia una señal más débil en el citoplasma.

La localización subcelular de *UTP18-GFP* reveló una distribución homogénea en el nucleolo, pero con acumulación en regiones específicas en el citoplasma, lo cual sugiere su presencia en los ribosomas o una función extrarribosómica que habrá que estudiar. Hemos manejado plantas heterocigóticas entre el alelo silvestre y el alelo insercional *utp18-1*, probablemente nulo, que causa letalidad gametofítica cuando está en homocigosis y cuyo fenotipo hemos rescatado parcialmente con el transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP*. Las plantas obtenidas tienen el fenotipo característico de mutantes en genes implicados en la biogénesis del ribosoma. Este resultado es especialmente relevante para el laboratorio ya que permitirá estudiar en detalle los efectos de la pérdida de función parcial de *UTP18*, ya que con las plantas *utp18-1* ha resultado imposible, al ser letales. Por ejemplo, se podrán realizar ensayos de hibridación de tipo *northern* con las plantas *utp18-1/utp18-1* parcialmente rescatadas con el transgén *UTP18_{pro}:UTP18:GFP* para determinar la función de *UTP18* en el procesamiento del pre-ARNr 45S.

Hemos finalizado la transferencia de las construcciones *RRP36_{pro}:RRP36:GFP* y *POL5_{pro}:POL5:GFP* a *Agrobacterium tumefaciens* y a *Arabidopsis*, en cuyas raíces hemos determinado que *RRP36* y *POL5* son nucleolares, aunque *POL5*, a diferencia de *RRP36*, presenta una distribución desigual en el nucleolo. Además, hemos obtenido plantas *pol5-1*

portadoras del transgén *POL5_{pro}:POL5:GFP* cuyo fenotipo es silvestre, rescatando el transgén la letalidad embrionaria que causa la homocigosis de *pol5-1*, y revelando, por tanto que la localización que hemos encontrado es la de la proteína POL5 endógena, más allá de las predicciones.

Como esperábamos todas las proteínas son nucleolares, dada la hipótesis de que participan en la regulación de la expresión del ADNr 45S y en el procesamiento temprano del pre-ARNr 45S. Se deberá profundizar en la función específica de cada proteína mediante su coimmunoprecipitación, para la identificación de sus interactores. Se analizará también la expresión del ADNr 45S para determinar si pudieran participar también en la regulación de su expresión. Además, se podrían llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con las proteínas de fusión con la GFP, para establecer si se unen al promotor del ADNr 45S. Una vez se obtenga un alelo de pérdida de función para RRP36, se deberá transformar con la construcción *RRP36_{pro}:RRR36:GFP* para obtener el rescate fenotípico del mutante.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Bechtold, N., y Pelletier, G. (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**, 259-266.
- Blum, T., Briesemeister, S., y Kohlbacher, O. (2009). MultiLoc2: integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. *BMC Bioinformatics* **10**, 274.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M., y Lamond, A.I. (2010). The nucleolus under stress. *Molecular Cell* **40**, 216-227.
- Braun, C.M., Hackert, P., Schmid, C.E., Bohnsack, M.T., Bohnsack, K.E., y Perez-Fernandez, J. (2020). Pol5 is required for recycling of small subunit biogenesis factors and for formation of the peptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research* **48**, 405-420.
- Briesemeister, S., Rahnenfuhrer, J., y Kohlbacher, O. (2010). YLoc-an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Research* **38**, 497-502.
- Cabezas-Fuster, A., Micol-Ponce, R., Fontcuberta-Cervera, S., y Ponce, M.R. (2022). Missplicing suppressor alleles of *Arabidopsis PRE-MRNA PROCESSING FACTOR 8* increase splicing fidelity by reducing the use of novel splice sites. *Nucleic Acids Research* **50**, 5513-5527.
- Calo, E., Flynn, R.A., Martin, L., Spitale, R.C., Chang, H.Y., y Wysocka, J. (2015). RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature* **518**, 249-253.
- Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- de la Cruz, J., Karbstein, K., y Woolford, J.L. (2015). Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes *in vivo*. *Annual Review of Biochemistry* **84**, 93-129.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Fernández-Abalos, J.M., Fox, H., Pitt, C., Wells, B., y Doonan, J.H. (1998). Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **27**, 121-130.
- Gerbi, S.A., y Borovjagin, A. (1997). U3 snoRNA may recycle through different compartments of the nucleolus. *Chromosoma* **105**, 401-406.
- Gérus, M., Bonnart, C., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y., y Henras, A.K. (2010). Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 1130-1144.
- Grebenok, R.J., Pierson, E., Lambert, G.M., Gong, F.C., Afonso, C.L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C., y Galbraith, D.W. (1997). Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant Journal* **11**, 573-586.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., y Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research* **35**, 585-587.
- Huang, C.K., Shen, Y.L., Huang, L.F., Wu, S.J., Yeh, C.H., y Lu, C.A. (2016). The DEAD-Box RNA Helicase AtRH7/PRH75 participates in pre-rRNA processing, plant development and cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **57**, 174-191.
- Jiang, Y., Wang, D., Yao, Y., Eubel, H., Kunzler, P., Moller, I.M., y Xu, D. (2021). MULocDeep: a deep-learning framework for protein subcellular and suborganellar localization prediction with residue-level interpretation. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **19**, 4825-4839.

- Kalinina, N.O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A.J., y Taliansky, M. (2018). The multiple functions of the nucleolus in plant development, disease and stress responses. *Frontiers in Plant Science* **9**, 132.
- Karimi, M., Depicker, A., y Hilson, P. (2007). Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiology* **145**, 1144-1154.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in Arabidopsis. *Arabidopsis Information Service* **24**, 1-111.
- Lange, H., Zuber, H., Sement, F.M., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Brunaud, V., Berard, C., Bouteiller, N., Balzergue, S., Aubourg, S., Martin-Magniette, M.L., Vaucheret, H., y Gagliardi, D. (2014). The RNA helicases AtMTR4 and HEN2 target specific subsets of nuclear transcripts for degradation by the nuclear exosome in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **10**, e1004564.
- Martínez Fenoll, S. (2022). Análisis de la pérdida de función de los genes *POL5*, *UTP18*, *UTP22* y *RRP36* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics* **21**, 93-111.
- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., y Ponce, M.R. (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of Arabidopsis *ARGONAUTE1*. *Scientific Reports* **4**, 5533.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., de Bures, A., Sáez-Vásquez, J., y Ponce, M.R. (2020). SMALL ORGAN4 is a ribosome biogenesis factor involved in 5.8S ribosomal RNA maturation. *Plant Physiology* **184**, 2022-2039.
- Micol Ponce, R. (2011). Aislamiento y caracterización de nuevas mutaciones supresoras del fenotipo de *argonaute1-52*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- O'Malley, R.C., Barragan, C.C., y Ecker, J.R. (2015). A user's guide to the Arabidopsis T-DNA insertion mutant collections. *Methods Mol Biol* **1284**, 323-342.
- Palm, D., Streit, D., Shanmugam, T., Weis, B.L., Ruprecht, M., Simm, S., y Schleiff, E. (2019). Plant-specific ribosome biogenesis factors in *Arabidopsis thaliana* with essential function in rRNA processing. *Nucleic Acids Research* **47**, 1880-1895.
- Pierleoni, A., Martelli, P.L., Fariselli, P., y Casadio, R. (2006). BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics* **22**, 408-416.
- Ramos-Sáenz, A., González-Álvarez, D., Rodríguez-Galán, O., Rodríguez-Gil, A., Gaspar, S.G., Villalobo, E., Dosil, M., y de la Cruz, J. (2019). Pol5 is an essential ribosome biogenesis factor required for 60S ribosomal subunit maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **25**, 1561-1575.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., y Weisshaar, B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Molecular and Cellular Biology* **53**, 247-259.
- Sáez-Vásquez, J., y Delseny, M. (2019). Ribosome biogenesis in plants: from functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell* **31**, 1945-1967.
- Sánchez-García, A.B., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., y Ponce, M.R. (2015). Arabidopsis *MAS2*, an essential gene that encodes a homolog of animal NF- κ B activating protein, is involved in 45S ribosomal DNA silencing. *Plant Cell* **27**, 1999-2015.
- Shaw, P., y Brown, J. (2012). Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiology* **158**, 44-51.

- Shimizu, K., Kawasaki, Y., Hiraga, S., Tawaramoto, M., Nakashima, N., y Sugino, A. (2002). The fifth essential DNA polymerase phi in *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the nucleolus and plays an important role in synthesis of rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 9133-9138.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., y Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H., y Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development* **9**, 1797-1810.
- Tan, B.C., Yang, C.C., Hsieh, C.L., Chou, Y.H., Zhong, C.Z., Yung, B.Y., y Liu, H. (2012). Epigenetic silencing of ribosomal RNA genes by Mybbp1a. *Journal of biomedical science* **19**, 57.
- Thoms, M., Thomson, E., Bassler, J., Gnadig, M., Griesel, S., y Hurt, E. (2015). The exosome is recruited to RNA substrates through specific adaptor proteins. *Cell* **162**, 1029-1038.
- Urawa, H., Hidaka, M., Ishiguro, S., Okada, K., y Horiuchi, T. (2001). Enhanced homologous recombination caused by the non-transcribed spacer of the rDNA in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics* **266**, 546-555.
- Vázquez Pagán, L. (2022). Síntesis de transgenes para establecer la localización subcelular de los factores PRH75, UTP18, RRP36 y POL5 de Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Yang, W., Rogozin, I.B., y Koonin, E.V. (2003). Yeast POL5 is an evolutionarily conserved regulator of rDNA transcription unrelated to any known DNA polymerases. *Cell Cycle* **2**, 120-122.