

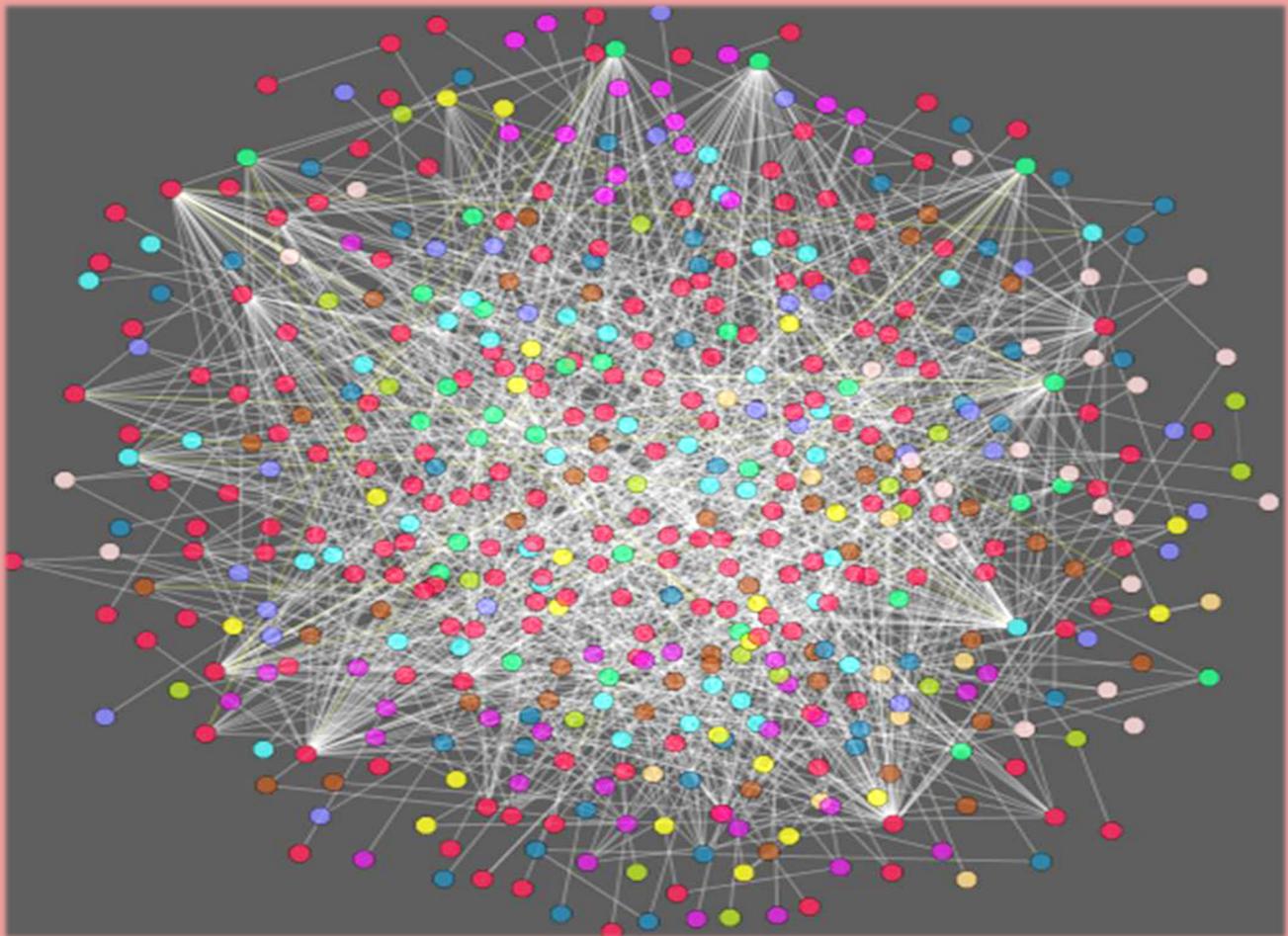


**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

“Análisis a gran escala de interacciones entre proteínas de membrana empleando el ensayo de las Split-ubiquitin en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”



**M^a Cristina Vilariño Becerra
Tesis doctoral 2012**

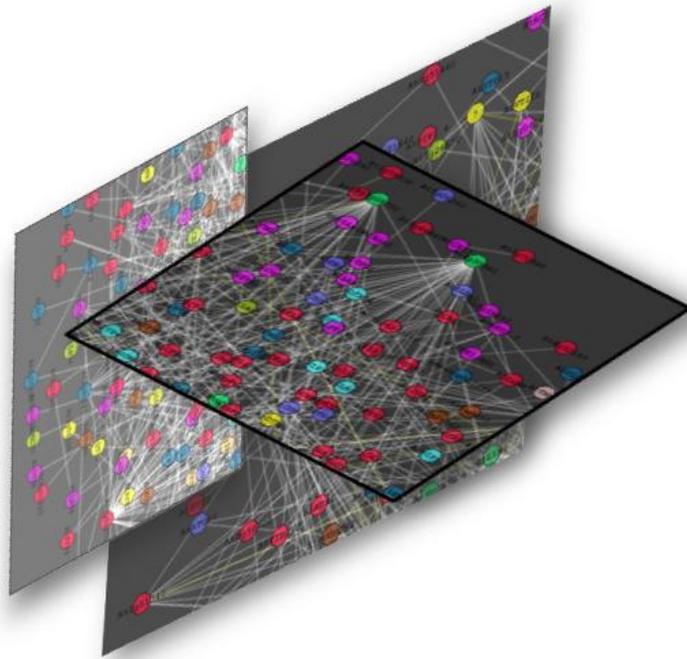


**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



“Análisis a gran escala de interacciones entre proteínas de membrana empleando el ensayo de las Split-ubiquitin en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”

M^a Cristina Vilariño Becerra

Tesis doctoral

2012



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

“Análisis a gran escala de interacciones entre proteínas de membrana empleando el ensayo de las Split-ubiquitin en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”

Memoria presentada por M^a Cristina Vilariño Becerra para optar al grado de Doctora en Bioquímica.

Salamanca, a de septiembre de 2012



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

D. Luis Román Fernández Lago, Director en funciones del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Análisis a gran escala de interacciones entre proteínas de membrana empleando el ensayo de las Split-ubiquitin en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” presentada por Dña. M^a Cristina Vilariño Becerra para optar al grado de Doctor en Bioquímica, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. José Luis Revuelta Doval en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca de septiembre de dos mil doce.

Fdo. Luis Román Fernández Lago



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

D. José Luis Revuelta Doval, Catedrático de Genética de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “Análisis a gran escala de interacciones entre proteínas de membrana empleando el ensayo de las Split-ubiquitin en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” que presenta la doctoranda M^a Cristina Vilariño Becerra ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca a de septiembre de dos mil doce.

Fdo. José Luis Revuelta Doval

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AAAP	Amino Acid Auxin Permease
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APC	Amino acid-Polyamine Organocation
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Grado centígrado
C-terminal	Carboxilo terminal
CAT	Cationic Aminoacid Transporter
CMV	Citomegalovirus
CNCG	Cyclic Nucleotic Gate Channel
Cub	Polipéptido comprendido del aminoácido 35 al 76 de la ubiquitina en el que se incluye el extremo carboxilo
DO	Densidad óptica
<i>et al</i>	Y colaboradores
5'FOA	Ácido 5-fluororótico
G418	Geneticina
GDU	Glutamine Dumper
GO	Gene Ontology
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LAT	L-type Aminoacid Transporter
leu⁻	Auxótrofo para leucina
ml	Mililitros
MLO	Mildew resistance Locus O
µg	Microgramo

μl	Micro litro
μM	Micromolar
ng	Nanogramos
NIP	Nodulin Intrinsic protein.
nm	nanómetro
N-terminal	Amino terminal
Nub	Polipéptido comprendido del aminoácido 1 al 34 de la ubiquitina en el que se incluye el extremo amino
ORF	Open Reading Frame (Fase de lectura abierta)
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
pg	Picogramos
p.ej.	Por ejemplo
PIP	Plasma membrane Intrinsic Protein
PUP	Purine Permease
p/v	Peso/volumen.
RE	Retículo endoplásmico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SIP	Small basic Intrinsic Protein
SUS	Sistema de la Split (rotura) de la ubiquitina
SU	Split (rotura) de la ubiquitina
TIP	Tonoplast Intrinsic Protein
Tm	Temperatura media de fusión
trp⁻	Auxótrofo para triptófano
UE	Unión Europea
VIC	Voltage-gated Ion Channel

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. LAS INTERACCIONES PROTEICAS	1
I.1.1. Tipos de interacciones proteicas.	2
Las interacciones proteicas directas.	2
Las interacciones proteicas indirectas o funcionales.	4
I.1.2. Métodos para el estudio de las interacciones entre proteínas.	4
I.1.2.a. Métodos computacionales para el análisis de las interacciones proteicas.	5
I.1.2.b. Métodos experimentales para el estudio de interacciones proteicas.	7
I.1.2.b.1. Métodos <i>in vitro</i> o bioquímico-biofísicos.	7
I.1.2.b.2. Métodos <i>in vivo</i> .	10
I.2. MÉTODO “SPLIT UBIQUITIN”	12
I.3. REVISIÓN DE LOS PROBLEMAS EN EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES CON PROTEÍNAS DE MEMBRANA	15
I.4. APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO A GRAN ESCALA DE LAS INTERACCIONES PROTEICAS	17
II. OBJETIVOS	19
III. RESULTADOS	21
III.1. DESARROLLO DEL SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS DE LA “SPLIT UBIQUITIN” (SU) PARA SU USO A GRAN ESCALA	21
III.1.1. Construcción de cepas para el sistema SU a gran escala.	21
III.1.2. Diseño y construcción de los vectores necesarios para el sistema de la SU aplicado a gran escala.	24
III.1.3. Análisis y comprobación de los vectores y cepas construidos.	28
III.2. INTERACTOMA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>.	32
III.3. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS TRANSFORMANTES DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> PORTADORAS DEL EXTREMO AMINO Y CARBOXILO DE LA UBIQUITINA.	35
III.4. ENSAYO DE INTERACCIÓN “SPLIT UBIQUITIN” DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.	37

III.4.1. Análisis del comportamiento de los controles en el análisis a gran escala.	38
III.4.1.a. Análisis de crecimiento de los controles negativos.	39
III.4.1.b. Análisis de los controles positivos.	41
III.4.2. Tratamiento estadístico de los datos derivados del ensayo de la SU.	43
III.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO SU.	44
III.5.1. Interacciones recíprocas	45
III.5.2. Análisis comparativo de los resultados obtenidos con distintas bases de datos.	46
III.5.3. Análisis individualizado de las interacciones entre las proteínas acuaporinas.	54
III.5.3.a. Resultados de las interacciones entre las proteínas PIPs.	55
III.5.3.b. Análisis de las interacciones proteicas de las proteínas TIP por el método SU.	61
III.5.3.c. Resultados del sistema SU entre las proteínas NIPs.	61
IV. DISCUSIÓN	63
Interacciones entre las acuoporinas de <i>A. thaliana</i> .	66
Interacciones de las proteínas transportadoras de nitratos.	69
Interacciones de proteínas de la superfamilia VIC (Voltage-gated Ion Channel).	71
Interacciones de la familia de los antiporters monovalentes catión: protón (NHX).	73
Interacciones de la familia de las permeasas de purinas.	75
Análisis de las interacciones obtenidas con los transportadores de auxinas.	76
Interacciones de la superfamilia APC (Amino Acid-Polyamine-Organocation).	78
Familia MLO (Mildew resistance Locus O).	79
V. CONCLUSIONES	83
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	85
VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO	85
VI.1.1. Cepas de <i>E. coli</i> .	85
VI.1.2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> .	85
VI.2. MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS	92

VI.2.1. <i>E. coli</i> .	92
VI.2.2. <i>S. cerevisiae</i>	93
VI.3. VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS	93
VI.3.1. Vectores.	93
VI.3.2. Oligonucleótidos.	96
VI.4. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	98
VI.4.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .	98
VI.4.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i> .	98
VI.4.3. Obtención de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i> .	99
VI.5. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	99
VI.5.1. Transformación de células de <i>E. coli</i> .	99
VI.5.2. Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> .	100
VI.6. MANIPULACIÓN DEL ADN	100
VI.6.1. Digestión enzimática.	100
VI.6.2. Ligación de fragmentos de ADN.	100
VI.6.3. Electroforesis de ADN.	100
VI.6.4. Purificación de un fragmento de ADN en el gel de agarosa o en solución.	101
VI.6.5. Amplificación de fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	101
VI.6.6. Secuenciación de ADN.	102
VI.7. MANIPULACIÓN DEL ARN	102
VI.7.1. Síntesis de ADN complementario (ADNc).	102
VI.8. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	102
VI.8.1. Obtención de extractos proteicos de <i>S. cerevisiae</i> .	102
VI.8.2. Precipitación de las proteínas de <i>S. cerevisiae</i> .	103
VI.8.3. Separación electroforética de proteínas.	103
VI.8.4. Detección de proteínas con epítopos inmunoreactivos.	104
VI.9. ENSAYO DE LA SU	105
VI.9.1. Ensayo de crecimiento.	105
VI.9.2. Análisis de la actividad β -galactosidasa.	106
VI.9.3. Proceso de estandarización.	107
VI.10. SOPORTE INFORMÁTICO	107
VII. BIBLIOGRAFÍA	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de la SU basado en el transactivador.	14
Figura 2. Construcción de la cepa portadora del gen reportero <i>lexA-HIS3</i> .	23
Figura 3. Vectores que fusionan el extremo amino de la ubiquitina (Nub).	25
Figura 4. Vectores que fusionan el extremo carboxilo de la ubiquitina (Cub).	27
Figura 5. Análisis por Western blot de la capacidad de represión de los plásmidos Cub.	28
Figura 6. Resultados del ensayo de la SU con el plásmido TET-Cub y las proteínas control OST1 y WBP1.	30
Figura 7. Resultados del ensayo de la SU con el plásmido MetYCGate y las proteínas control OST1 y WBP1.	31
Figura 8. Caracterización del grupo proteico analizado en el ensayo a gran escala utilizando el programa GO Slim Classification for Plants (base de datos TAIR).	33
Figura 9. Clasificación de las proteínas analizadas en el ensayo ómico en base de sus dominios transmembrana.	34
Figura 10. Construcción de cepas transformantes para el ensayo SU a gran escala por el método de recombinación <i>in vivo</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	36
Figura 11. Distribución de las DO ₅₉₅ de los diploides utilizados como control negativo.	40
Figura 12. Distribución de las DO ₅₉₅ de los diploides formados con las cepas Y-Cub y la cepa utilizada como control positivo.	42
Figura 13. Distribución de los valores obtenidos para la proteína At1g19770-Cub y para la proteína At1g22550-Cub tras medir la densidad óptica a 595nm y tras el proceso de estandarización.	44
Figura 14. Ensayo SU individualizado de las parejas proteicas AtKAT1-AtKAT1 y AtKAT1-AtAkt1.	48
Figura 15. Perfiles hidrofóbicos de las proteínas SNARE: AtSYP21 (<i>At5g16830</i>), AtVTI11 (<i>At5g39510</i>), AtSYP22 (<i>At5g46860</i>).	51
Figura 16. Ensayos SU con tres proteínas de la familia SNARE, AtVTI1p, AtSYP21p, AtSYP22p.	52

Figura 17. Análisis de la expresión proteica por Western blot de las proteínas PIP-Cubs y PIP-Nubs.	56
Figura 18. Ensayo SU con las proteínas PIP-Nub.	56
Figura 19. Análisis de liberación del factor PLV de los diploides formados por proteínas PIP-Nub y PIP-Cub mediante un ensayo de Western blot.	58
Figura 20. Análisis Western blot de las proteínas Nub-PIP.	59
Figura 21. Ensayo SU individualizado con las proteínas Nub-AtPIP.	59
Figura 22. Ensayo individualizado SU con la subfamilia TIP.	61
Figura 23. Ensayos SU con las acuoporinas AtNIP6;1 y AtNIP7;1.	62
Figura 24. Representación gráfica de las interacciones obtenidas entre las acuoporinas PIP.	67
Figura 25. Representación gráfica de las interacciones obtenidas con las familias NRT1 y NRT2.	69
Figura 26. Representación gráfica de las interacciones que suceden con las proteínas CNGC.	72
Figura 27. Representación gráfica de las interacciones positivas obtenidas con la familia proteica NHX.	74
Figura 28. Representación gráfica de las interacciones en las que están implicadas las proteínas purina permesasa.	76
Figura 29. Representación gráfica de las interacciones en las que participan los transportadores de auxinas.	77
Figura 30. Representación gráfica de las interacciones obtenidas con la superfamilia APC.	78
Figura 31. Representación gráfica de las interacciones en las que participan las proteínas MLO.	80
Figura 32. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los ORF empleados en el estudio a gran escala.	98
Figura 33. Experimento de la SU adaptado a gran escala.	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla modelo de los resultados obtenidos.	38
Tabla 2. Cepas Cub que no superan el control negativo.	40
Tabla 3. Cepas Cub que no superan el control positivo.	42
Tabla 4. Interacciones recíprocas obtenidas en el ensayo SU realizado.	45
Tabla 5. Interacciones proteicas físicas corroboradas en el ensayo realizado.	47
Tabla 6. Interacciones proteicas identificadas experimentalmente y que no solapan con los resultados obtenidos.	49
Tabla 7. Interacciones predichas por bases de datos de interacciones proteicas que se confirman en este trabajo.	53
Tabla 8. Interacciones entre las proteínas PIP que solapan con las bases de datos AtPID, AIV.	60
Tabla 9. Cepas bacterianas.	85
Tabla 10. Cepas de levadura.	85
Tabla 11. Cepas transformantes de levadura utilizadas en el ensayo SU a gran escala.	88
Tabla 12. Cepas de levadura utilizadas en los ensayos SU individualizados.	92
Tabla 13. Oligonucleótidos empleados.	96

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LAS INTERACCIONES PROTEICAS

En la actualidad, es difícil comprender la actividad biológica de las proteínas de manera aislada, ya que la mayoría de las rutas funcionales y procesos celulares están determinados por asociaciones proteicas. De hecho, se estima que en el hombre un 80% de las proteínas ejercen su función correctamente gracias a las interacciones proteicas (Berggård *et al.*, 2007). Los análisis de las interacciones proteicas a gran escala generan una gran cantidad de información que es integrada en diferentes bases de datos y da lugar a complejas redes de proteínas que son representadas en mapas de interacciones proteicas o interactomas. A través del análisis de estos complicados interactomas, se ha llegado a proponer que la complejidad de los organismos no depende únicamente del número de proteínas codificadas en sus genomas, sino que también está relacionada con el número de interacciones que existen entre las proteínas de ese organismo, de forma que su complejidad aumenta a medida que muestra mayor número de interacciones (Claverie., 2001).

Los complejos de proteínas son responsables de un sinnúmero de funciones, como por ejemplo la replicación del ADN, la transcripción, la secreción de proteínas, el control del ciclo celular, la transducción de señales, las reacciones del metabolismo secundario, el control postranscripcional de distintas actividades proteicas, el transporte de sustancias y el mantenimiento homeostático (Phizicky *et al.*, 1995; Brohée *et al.*, 2006). Por este motivo, las interacciones proteicas son imprescindibles para el buen funcionamiento de células, tejidos, órganos y organismos, y su formación y composición deben estar controladas rigurosamente para evitar interacciones proteicas aleatorias.

Para que tenga lugar la interacción entre proteínas el proceso debe ser energéticamente favorable. Dado que las proteínas pierden entropía al interactuar, esta pérdida es compensada por dos factores principales: el incremento de entropía de las moléculas de solvente que son expulsadas de la interfase recién formada y el incremento de entalpía correspondiente a la formación de nuevos enlaces de hidrógeno, de interacciones de Van der Waals y puentes salinos en la nueva interfase (Levy *et al.*, 2008).

Con frecuencia, las interacciones proteicas también están reguladas por la unión de otras moléculas (ácidos nucleicos, iones como el Ca^{2+} , etc.) que alteran la afinidad de las proteínas en función de las necesidades de la célula (Berggård *et al.*, 2007).

Las condiciones fisicoquímicas mencionadas no son suficientes para que se lleve a cabo una interacción entre proteínas a nivel celular sino que, además, es necesario que las proteínas que interactúan coincidan temporal y espacialmente. Esta colocación y cotemporalidad están finamente reguladas permitiendo un eficaz control sobre el momento y el lugar en que tienen lugar las interacciones proteicas (Wang *et al.*, 2009).

El análisis de las interacciones proteicas representa en la actualidad un activo tema de estudio ya que proporciona una gran cantidad de información sobre los complejos que se forman y de las proteínas que participan en ellos. En el caso de proteínas no caracterizadas funcionalmente, el estudio de sus interacciones proteicas sirve de punto de partida para elucidar cuál es su función, su regulación y su localización (Phizicky *et al.*, 1995).

I.1.1 Tipos de interacciones proteicas.

Las interacciones proteicas se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Interacciones proteicas directas o físicas.
- Interacciones proteicas indirectas o funcionales.

Las interacciones proteicas directas:

Se denominan interacciones proteicas directas o físicas aquellas en las que las proteínas participantes están en contacto a través de superficies proteicas determinadas. Dependiendo de su estabilidad, de su composición o de su especificidad se pueden describir varios tipos de interacciones proteicas directas. Estas interacciones pueden dar distintos tipos de complejos que también se describen a continuación.

Atendiendo a la estabilidad de la interacción o al tiempo de vida del complejo formado, las interacciones se pueden distinguir entre interacciones permanentes e interacciones transitorias. Mientras que en las interacciones permanentes las proteínas pueden formar complejos proteicos estables y las proteínas que interactúan son subunidades proteicas de un complejo que desempeña una determinada función; en las interacciones transitorias las proteínas se unen solamente de forma pasajera. Las interacciones transitorias son de carácter más polar y tienen lugar en zonas de contacto más pequeñas que las interacciones transitorias (Nooren *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2008).

Un claro ejemplo de interacción permanente es el complejo del poro, formado por complicados ensamblajes de polipéptidos que atraviesan la membrana nuclear para permitir el

transporte de moléculas entre el citoplasma y el núcleo (Phizicky *et al.*, 1995; De las Rivas *et al.*, 2004).

Por otra parte, numerosos procesos biológicos, entre los que destacan las modificaciones proteicas como fosforilación/defosforilación, metilación, acetilación o proteólisis específica, son dependientes de interacciones proteicas transitorias. Las interacciones transitorias también regulan gran variedad de procesos fundamentales como el crecimiento, el ciclo celular, las reacciones metabólicas, la regulación transcripcional, las cascadas de señalización y el reclutamiento de proteínas en la formación y destrucción de estructuras temporales (Phizicky *et al.*, 1995, De las Rivas *et al.*, 2004; Ghavidel *et al.*, 2005).

Otro aspecto que diferencia las diversas interacciones es la especificidad. Las proteínas pueden interactuar a través de una superficie de interacción muy concreta y específica que es complementaria con la superficie de la proteína a la que se une. Alternativamente, las proteínas también pueden interactuar de manera menos específica, lo que permite que una proteína determinada pueda formar múltiples parejas de interacción. Estas proteínas con baja especificidad “compiten” o comparten la misma superficie o superficies superpuestas de interacción. Las interacciones de baja especificidad son comunes y abundantes entre las interacciones proteicas y hacen posible que distintas proteínas interactúen con una misma proteína y puedan desarrollar una misma función, funciones muy similares o distintas funciones.

A este respecto, hay que resaltar que la especificidad de las interacciones *in vivo* no depende solo de la complementariedad de la estructura y los componentes físico-químicos de la superficie de unión, sino que hay que tener en cuenta otros factores que regulan la especificidad a nivel celular como son la coexpresión, la colocalización, la concentración de proteínas competidoras o la concentración de determinadas moléculas que alteran o modifican la estructura proteica (Nooren *et al.*, 2003).

Cuando se considera el tipo de proteínas que forman la interacción, las interacciones pueden ser homoproteicas cuando están formadas por un único tipo de proteína o heteroproteicas cuando las proteínas que interactúan son distintas.

Entre las proteínas que forman estructuras homoméricas destacan un gran número de proteínas transportadoras, proteínas “scaffold” y enzimas. La formación de complejos homoméricos confiere ventajas adicionales en términos de regulación, ya que permite el

control de su actividad en función de la concentración de ligandos o de la concentración de la proteína que forma el complejo.

Las interacciones heteroproteicas son más numerosas que las homoméricas y se caracterizan por estar involucradas en funciones tan relevantes como la transducción de señales, la inducción de cambios conformacionales en las proteínas, la degradación proteica, el control del equilibrio osmótico, etc. (Royer., 1999).

Por último, si se atiende a la dependencia que muestran las proteínas con la interacción en la que participan, se observa que existe una gradación entre aquellas proteínas que son totalmente dependientes de la interacción en la que participan al no ser funcionales y en algunos casos estables cuando se encuentran en forma de monómeros, y aquellas que, en cambio, no dependen de las interacciones en las que participan siendo estables y funcionales a nivel individual (Nooren *et al.*, 2003).

Las interacciones proteicas indirectas o funcionales:

Este tipo de interacciones son aquellas en las que no existe evidencia de interacción física entre las proteínas estudiadas pero existe evidencia de algún tipo de relación funcional, temporal y/o espacial.

Así, este tipo de interacciones pueden afectar a proteínas metabólicamente relacionadas que forman parte de una misma ruta biosintética; a proteínas genéticamente relacionadas a través de mecanismos de coexpresión o correulación; o a proteínas que están ubicadas en el mismo compartimento celular.

Aunque las interacciones indirectas no se pueden entender en sentido estricto como interacciones, su conocimiento puede contribuir a la identificación de nuevas interacciones físicas (De las Rivas., 2004).

I.1.2. Métodos para el estudio de las interacciones entre proteínas.

El interés por el estudio de las interacciones proteicas ha potenciado el desarrollo de una variedad de técnicas de análisis de interacciones que pueden basarse en métodos experimentales (empíricos) o métodos computacionales (teóricos) que predicen posibles interacciones proteicas. La elección de un determinado método para el análisis de interacciones proteicas depende principalmente del tipo de proteínas, ya que influyen factores como la solubilidad, la localización, la estructura, el nivel o el tiempo de expresión

característicos de cada proteína. Además, también es importante para la selección del método de análisis el número de proteínas que se quiere analizar, ya que existen métodos adecuados para el estudio de la interacción de parejas proteicas y métodos destinados al ensayo de un conjunto numeroso de proteínas que interactúan con una proteína de interés. También se han desarrollado estrategias específicas según la magnitud de las proteínas en estudio que abarcan desde un número reducido de proteínas a ensayos “ómicos” que incluyen todas, o una gran parte, de las proteínas de un organismo.

I.1.2.a. Métodos computacionales para el análisis de las interacciones proteicas.

La comprensión de las funciones de las proteínas codificadas y sus interacciones es una parte fundamental en el análisis funcional de un genoma. Los recientes avances en el análisis experimental de las interacciones proteicas y la aplicación de estrategias “ómicas” aportan una gran cantidad de resultados e información. Sin embargo, ninguna técnica experimental es capaz por sí sola de detectar todas las interacciones proteicas y, además, los datos obtenidos utilizando distintas técnicas experimentales son a veces contradictorios, poniendo de manifiesto las limitaciones de las aproximaciones exclusivamente empíricas (Bader *et al.*, 2002; von Mering *et al.*, 2002).

Por estos motivos, se están desarrollando métodos computacionales que, basados en modelos teóricos obtenidos a partir de ensayos empíricos, son capaces de predecir posibles interacciones proteicas.

Las aproximaciones computacionales son de gran utilidad tanto como punto de partida en la búsqueda de interacciones entre proteínas, como para validar resultados experimentales y para aportar información en aquellos casos en los que no es factible la aplicación de los métodos experimentales. Además, la aplicación de métodos teóricos es menos costosa y resulta más rápida y sencilla que la de métodos experimentales.

Los métodos computacionales de interacciones proteicas pueden ser clasificados en dos grandes grupos en función de si están basados o no en la estructura proteica (Szilágyi *et al.*, 2005).

Los métodos no basados en la estructura proteica requieren un conocimiento biológico *a priori* que puede consistir en la conservación de diferentes tipos de contextos genómicos como la presencia o ausencia de determinados grupos de genes en especies relacionadas (perfiles filogenéticos), la conservación de genes vecinos en bacterias y arqueobacterias (conservación del contexto genómico local), o la presencia de genes cuyos homólogos en

otros organismos se encuentran fusionados (análisis de fusiones génicas) (Huynen *et al.*, 2000, Shoemaker *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2010).

Si bien estos métodos predicen con bastante precisión la existencia de genes que están funcionalmente relacionados, su extrapolación a la existencia de una interacción física entre las proteínas codificadas es dudosa. Aun así, estos métodos pueden tener cierta utilidad ya que se ha demostrado que un 63% de las parejas de proteínas codificadas por genes vecinos y que están conservados en organismos filogenéticamente alejados interaccionan físicamente, bien de forma directa (30%) o indirecta (33%) (Huynen *et al.*, 2000). En el mismo sentido, también se han aportado evidencias de que un 55% de las proteínas de *Mycoplasma genitalium*, fusionadas en otros organismos pero no en *Mycoplasma*, interaccionan físicamente de forma directa (Huynen *et al.*, 2000).

Otra clase de métodos no basados en la estructura proteica parten de la premisa de que las parejas de proteínas que interaccionan físicamente han de evolucionar de forma coordinada para preservar los contactos entre ellas. Esta clase de métodos, que probablemente son capaces de predecir relaciones no solamente funcionales sino también físicas, pueden basarse en el hecho de que los árboles filogenéticos de las proteínas que interaccionan físicamente poseen un mayor grado de similitud que el de las proteínas que no muestran interacción (similitud de árbol filogenético o mirrortree) (Pazos *et al.*, 2001; Juan *et al.*, 2008). También pueden estar basados en la hipótesis de que la coadaptación de las proteínas que interaccionan entre sí puede ser detectada por la presencia de mutaciones compensatorias en los correspondientes homólogos de diferentes especies (dos híbridos *in silico*) (Pazos *et al.*, 2002). Incluso, estos métodos pueden estar basados en la observación de que las proteínas que interaccionan suelen presentar un patrón de expresión similar para mantener la estequiometría adecuada (coevolución de la expresión génica) (Szilágyi *et al.*, 2005).

Todos estos métodos no basados en la estructura proteica dependen de la comparación de secuencias (nucleótidos o aminoácidos) y, por tanto, su eficacia está determinada por el número de secuencias de genomas disponibles.

La otra clase de métodos computacionales están basados en la estructura proteica y requieren el conocimiento previo de la estructura de una proteína homóloga o de algún complejo del que esta forme parte; motivo por el que su aplicación es muy restringida y está limitada a proteínas de estructura conocida.

Algunos de estos métodos parten de estructuras conocidas, cuyos componentes son homólogos o similares a aquellas proteínas cuyas estructuras e interacciones serán modeladas

teniendo, como base, su semejanza. El fundamento en el que se sustentan estas aproximaciones es que la información de la interacción de un complejo puede ser extrapolada a los homólogos de las proteínas de dicho complejo. De hecho, se ha demostrado que los homólogos con una identidad superior al 30-40% casi siempre interactúan del mismo modo (Aloy *et al.*, 2003). Otros métodos, como Multiprospector y M-Tasser, pretenden predecir interacciones entre proteínas cuya estructura es desconocida a través de sucesivas etapas de modelización de la estructura cuaternaria de las proteínas y de los posibles complejos basándose en plegamientos estructurales conocidos (“multimeric threading”) (Lu *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008; Tuncbag *et al.*, 2011). Por último, otros métodos, denominados “docking”, han sido diseñados para predecir la estructura tridimensional nativa de un complejo proteico multimérico a partir de las coordenadas atómicas de las proteínas que lo componen. Aunque estos métodos pueden beneficiarse de datos experimentales previos como los sitios de unión o los residuos implicados en las interacciones, también pueden proponer modelos probables del complejo sin ningún tipo de información previa. Todos los métodos de “docking” se basan en la premisa de que las proteínas que interactúan deben poseer cierto grado de complementariedad en sus formas que permitan el acoplamiento (Smith *et al.*, 2002).

I.1.2.b. Métodos experimentales para el estudio de interacciones proteicas

Las técnicas experimentales para el ensayo de interacciones de proteínas pueden basarse en el uso de células enteras vivas (*in vivo*) o en el uso de extractos celulares más o menos complejos (*in vitro*). Mientras que esta clasificación está bien definida para algunos métodos, otros han ido evolucionando hasta adaptarse a estrategias útiles tanto para su aplicación *in vivo* como *in vitro*.

I.1.2.b.1. Métodos *in vitro* o bioquímico-biofísicos.

Entre los métodos *in vitro* se pueden destacar:

- **Coinmunoprecipitación.** Este ensayo se basa en la técnica de inmunoprecipitación por afinidad de una proteína, generalmente etiquetada, que permite la coprecipitación selectiva de las proteínas que interactúan con ella (Adams *et al.*, 2005).

La técnica de coinmunoprecipitación permite analizar tanto la interacción cruzada de una pareja de proteínas, en cuyo caso es frecuente el marcaje de las dos proteínas con epítomos distintos, como la del conjunto de proteínas que interactúan con una

determinada proteína. En este último caso, las proteínas coimmunoprecipitadas deben ser a continuación identificadas por métodos analíticos adecuados como la espectrometría de masas.

La coimmunoprecipitación es una de las técnicas más utilizadas y fiables en el análisis de interacciones físicas entre proteínas, siendo una de sus mayores ventajas el poder estudiar las interacciones proteicas de manera endógena, utilizando proteínas controladas por su propio promotor lo que evita los posibles problemas derivados de la sobreexpresión de las proteínas objeto de estudio (Berggård *et al.*, 2007; Miernyk *et al.*, 2008).

- **Ensayos “pull down”.** Es una técnica similar a la coimmunoprecipitación en la que se utiliza una proteína cebo en lugar de un anticuerpo. La proteína cebo es etiquetada y capturada mediante un ligando de afinidad a una matriz, generándose así una matriz de afinidad secundaria para la purificación de otras proteínas que interaccionen con la proteína cebo. Esta matriz es incubada con un extracto proteico que contiene las posibles proteínas “presa” y que, tras su captura, son posteriormente eluidas para su estudio.

Esta técnica es adecuada tanto para el análisis de interacciones transitorias fuertes como interacciones estables; aunque no es eficaz en el análisis de interacciones transitorias débiles (Einarson *et al.*, 2005).

- **TAP (Tandem Affinity Purification).** Es una variante de la precipitación por afinidad en el que la proteína diana es etiquetada con un dominio denominado TAP que consta de dos sitios de unión de la inmunoglobulina G de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, una secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV y un péptido de unión a calmodulina. La proteína marcada y las proteínas que interaccionan con ella forman un complejo que será retenido selectivamente por el paso sucesivo a través de dos columnas de afinidad, una de IgG y otra de calmodulina. El método permite la purificación de complejos proteicos en condiciones nativas y niveles de expresión génica naturales (Puig *et al.*, 2001, Kuroda *et al.*, 2006). Como en el caso anterior, las proteínas que interaccionan con la proteína marcada pueden ser identificadas posteriormente por técnicas como la espectrometría de masas.

- **Análisis Far-Western:** Esta técnica se basa en la técnica Western blot convencional en la que las proteínas de un extracto son separadas por electroforesis en gel, transferidas a una membrana e identificadas con un anticuerpo específico. A diferencia del Western blot, el Far-Western no utiliza un anticuerpo como sonda sino una proteína cebo marcada (con un epítipo o radioactividad). La proteína cebo es capaz de identificar a las

proteínas presa inmovilizadas en la membrana a través de su unión. Una de las mayores desventajas de esta técnica es que se requiere una gran cantidad de proteína cebo purificada; lo que generalmente se consigue mediante su expresión heteróloga en *Escherichia coli* (Wu *et al.*, 2007; Machida *et al.*, 2009).

- **Arrays o Chips de proteínas.** A semejanza de los Chips de ADN convencionales, esta técnica consiste en la inmovilización de proteínas, anticuerpos, péptidos o carbohidratos en chips o arrays. La incubación de los chips de proteínas con proteínas marcadas en solución permitirá identificar a las proteínas o péptidos a los que son capaces de unirse. El principal inconveniente de esta técnica es la ausencia de un contexto fisiológico adecuado en el que se efectúen las interacciones, lo que puede propiciar la obtención de numerosos resultados falsos (Coleman *et al.*, 2007; Pieroni *et al.*, 2008).

- **“Label transfer/cross-linking” químico.** Esta técnica consiste en la unión de un conector o “cross-linker” específico a una proteína purificada. Este conector es capaz de reaccionar y establecer un enlace covalente con otra proteína que se encuentre muy próxima. La proximidad necesaria para activar el conector implica la interacción de ambas proteínas por lo que es un método muy apropiado para la detección de interacciones transitorias o de baja afinidad (Fancy., 2000; Berggård *et al.*, 2007).

Aunque esta técnica clásicamente se engloba como un método *in vitro*, actualmente se han adaptado técnicas basadas en el “label transfer/cross-linking” químico para su uso en el análisis de interacciones de proteínas *in vivo* (Alaedini *et al.*, 1999; Nadeau *et al.*, 2005).

- **Espectroscopía de Resonancia de plasmones superficiales (SPR).** Esta técnica consiste en el análisis de los pequeños cambios que existen en los índices de refracción de una luz láser emitida sobre una superficie, típicamente una lámina de oro o plata, en la que está unida la proteína o proteínas de interés cuando se pone en contacto con un extracto proteico. La formación de complejos proteicos hace que los índices de refracción varíen permitiendo identificar las interacciones proteicas (Berggård *et al.*, 2007). Este método proporciona una aproximación termodinámica y cinética de las interacciones entre proteínas. Sin embargo, su aplicación está limitada al análisis de proteínas solubles o proteínas de membrana truncadas ya que la fijación de proteínas con dominios hidrofóbicos y transmembrana es difícil y altera su conformación proteica (Kuroda *et al.*, 2006; Lalonde *et al.*, 2008).

- **Resonancia magnética nuclear (Nuclear Magnetic Resonance).** Este método se basa en la propiedad de absorción magnética de un núcleo activo tras ser sometido a un fuerte campo magnético. Las proteínas poseen núcleos activos, como ^{15}N o ^{13}C , cuyo comportamiento varía al ser sometidos a un campo magnético en función del entorno que les rodea. Así, cuando existen interacciones proteicas, los cambios químicos en el medio adyacente que experimentan estos núcleos activos permiten determinar si existe o no interacción entre proteínas e incluso la superficie específica donde tiene lugar la interacción (Gao *et al.*, 2004). Esta técnica permite un análisis dinámico de las interacciones proteicas en solución y es de gran utilidad en el caso de interacciones débiles entre proteínas que por otros métodos son difícilmente detectables (Russell *et al.*, 2004; Vaynberg *et al.*, 2006). Aunque su uso estaba inicialmente limitado a experimentos *in vitro*, actualmente se han desarrollado sistemas *in vivo* utilizando *E. coli* (Selenko *et al.*, 2006).

- **Espectrometría de masas.** La espectrometría de masas no es una técnica que esté dedicada de forma primaria al análisis de las interacciones proteicas. Sin embargo, esta técnica es muy eficaz en la identificación de proteínas a través de la estimación precisa de la masa atómica de la proteína completa o de los péptidos resultantes de su digestión y, por tanto, es aplicada en combinación con la mayoría de los métodos de interacción proteica descritos con anterioridad (TAP, “pull-down”, cross-linking, etc.) que proporcionan proteínas que interaccionan pero que requieren ser identificadas (Brymora *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 2006; Babu *et al.*, 2009).

- **Cristalografía de rayos X.** Esta técnica permite determinar a nivel atómico y estructural complejos proteicos identificados previamente por otros métodos y que deben ser purificados a nivel de homogeneidad para lograr la cristalización de las proteínas que los componen. El gran inconveniente de esta técnica es que requiere la previa identificación y purificación del complejo lo que supone la obtención de una gran concentración de las proteínas en estudio (Zhao *et al.*, 2005).

I.1.2.b.2. Métodos *in vivo*.

Además de los métodos *in vitro*, también se han desarrollado técnicas que utilizan organismos vivos para el estudio de las interacciones proteicas, que permiten mantener un ambiente celular similar al que tiene la proteína nativa.

Entre los métodos *in vivo* destacan:

- **FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) y BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer).** En ambos métodos una de las proteínas en estudio se etiqueta con un cromóforo donador de energía mientras que la otra se etiqueta con un cromóforo receptor. Cuando estas proteínas interactúan, se produce la transferencia energética desde el cromóforo excitado donador al receptor y la energía transferida produce un cambio en la fluorescencia del receptor que puede ser detectada por microscopía confocal de fluorescencia (Clegg ., 1995; Pflieger *et al.*, 2006)
- **Los sistemas cebo/presa o sistemas de dos híbridos.** La técnica de los sistemas cebo/presa requiere la coexpresión de dos proteínas quiméricas, una denominada cebo y otra presa, cuya interacción es capaz de reconstruir una proteína (factor de transcripción, ubiquitina, adenilato ciclasa, proteínas fluorescentes, luciferasa, timidina quinasa, etc.) que por sí misma, o mediante la activación de un gen o genes reporteros, confiere al organismo una propiedad detectable. La expresión de las proteínas quiméricas puede ser homóloga, si se realiza en el propio organismo del que proceden las proteínas cuya interacción se desea identificar, o heteróloga, si la expresión tiene lugar en organismos adecuados con sistemas de expresión de proteínas muy desarrollados como son *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* (Lalonde *et al.*, 2008).

Por su relevancia, merecen ser descritos los siguientes sistemas cebo-presa:

- Sistema clásico de dos híbridos. Este método se basa en la coexpresión en *S. cerevisiae* de dos proteínas quiméricas que están fusionadas a dominios proteicos que al unirse reconstruyen un factor de transcripción (Field *et al.*, 1989). Clásicamente, se utiliza el factor de transcripción Gal4p que puede dividirse en un dominio de unión al ADN denominado BD (binding domain) y un dominio de activación (AD). La interacción de las dos proteínas de fusión, cada una portadora de uno de los dominios AD o BD, permite la reconstrucción del factor de transcripción Gal4p que se une específicamente a la secuencia UAS del promotor de uno o más genes reporteros y activa su expresión. La activación de genes reporteros escogidos adecuadamente permite identificar fácilmente aquellas cepas que expresan proteínas quiméricas capaces de interactuar entre sí.
- Análisis de fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC). Es un método similar al clásico de dos híbridos en el que las proteínas quiméricas

están fusionadas a los dominios complementarios de una proteína fluorescente en lugar de a los de un factor activador transcripcional. Este método permite la expresión homóloga de las proteínas quiméricas, respetando su localización, expresión o interacción con otras moléculas de forma muy parecida a la de la proteína nativa. La interacción de las proteínas permite la reconstrucción de la proteína fluorescente, sea YFP, GFP u otra de las alternativas disponibles, y la visualización de la interacción por microscopía de fluorescencia (Sung *et al.*, 2007).

- Sistema de la ubiquitina dividida o “Split Ubiquitin System”. Como este método se utilizará en este trabajo se describe a continuación en detalle.

I.2. MÉTODO “SPLIT UBIQUITIN”

Para el estudio de las interacciones entre proteínas de membrana, o asociadas a membrana, uno de los métodos más útiles es el método de la “Split Ubiquitin” o SU. Este es un método *in vivo* del tipo cebo-presa en el cual las proteínas quiméricas se expresan en *S. cerevisiae*. Esta técnica *in vivo* no necesita la solubilización de las proteínas en análisis permitiendo su localización en membrana donde tienen una conformación similar a la nativa (Stagljar *et al.*, 1998).

La ubiquitina es una proteína ubicua en todas las células eucariotas cuya secuencia de 76 aminoácidos está muy conservada presentando una similitud superior al 95%. La principal función de la ubiquitina consiste en el etiquetado de proteínas que serán conducidas al proteosoma para su degradación; aunque también participa en otros procesos como la apoptosis, diferenciación, reparación del ADN, embriogénesis, transporte de membrana y transcripción (Lehming *et al.*, 2002).

La ubiquitina se une por su extremo carboxilo terminal a proteínas que van a ser degradadas por el proteosoma 26 (Pickart., 1988). La ubiquitina evita su degradación por el proteosoma gracias a la acción de proteasas específicas de ubiquitina (UBPs) que rompen la unión covalente que une la proteína ubiquitinada y la ubiquitina y permite a esta última reciclarse para etiquetar a una nueva proteína. Las UBPs actúan específicamente en el enlace entre el residuo de glicina del extremo carboxilo terminal de la ubiquitina y el primer residuo de la proteína marcada y solo ejercen su función si la ubiquitina tiene una conformación adecuada (Johnson, Varshavsky., 1994).

La ubiquitina puede ser dividida en dos polipéptidos, correspondientes a los aminoácidos 1-34 del extremo amino (dominio Nub) y a los aminoácidos 35 al 76 (dominio Cub), que poseen gran afinidad y se unen espontáneamente formando una ubiquitina pseudonativa que, igual que la ubiquitina nativa, es reconocida específicamente por las UBPs.

El método de dos híbridos de la SU aprovecha la capacidad de la proteína ubiquitina de sintetizarse como dos polipéptidos que reconstruyen la ubiquitina pseudonativa. En condiciones normales, los dominios Nub y Cub se unen con mucha afinidad y espontáneamente dificultando su uso en el ensayo SU. Para reducir dicha afinidad, en el ensayo SU se utiliza un dominio Nub mutante (G13I), denominado NubG, que solamente es capaz de unirse al dominio Cub y reconstruir la ubiquitina cuando ambos están muy próximos físicamente (Johnsson, Varshavsky., 1994).

Como en otros métodos de interacción de proteínas *in vivo* cebo-presa, en el método SU las dos proteínas cuya interacción se quiere identificar o analizar son etiquetadas con dos dominios. En el método SU estos dominios son el NubG y el Cub. Además, el dominio Cub está unido covalentemente a una proteína reportera o a un factor de transcripción capaz de activar los genes reporteros. De este modo, si las dos proteínas en estudio interaccionan, los dominios Cub y NubG de la ubiquitina estarán próximos y podrán reconstruir una ubiquitina pseudonativa que será reconocida por las UBPs. El corte catalizado por las UBPs producirá la liberación de la proteína reportera, o en su caso la del factor de transcripción y la consiguiente expresión de genes reporteros, y proporcionará a la célula alguna característica fenotípica que permitirá diferenciarla de manera clara y sencilla de aquellas células en las que no hay interacción.

Tomando como referencia el sistema descrito se han desarrollado algunos métodos variantes de la SU :

- El sistema de la SU basado en el rUra3. En este método el dominio Cub se une en fase a la secuencia que codifica para la proteína rUra3 quedando el dominio proteico Cub unido covalentemente por su extremo carboxilo a la proteína rUra3. La proteína rUra3 difiere de la proteína Ura3 nativa en que a la proteína rUra se le ha añadido un residuo de arginina en su extremo amino terminal lo que la hace altamente susceptible de degradación cuando se encuentra libre en el citoplasma.

En esta técnica cuando existe interacción entre las proteínas quiméricas Cub y Nub se libera la proteína rUra3 que será rápidamente degradada, provocando que la cepa de

levadura adquiera auxotrofia para el uracilo y resistencia a la droga 5-fluororótico lo que permite seleccionar las cepas que expresan proteínas que interaccionan.

- Sistema basado en el transactivador o el sistema de dos híbridos de proteínas de membrana (MbyTH). En este sistema, el dominio Cub está fusionado en fase a un factor de transcripción híbrido artificial, denominado CUB-LexA-VP16 o CUB-TF, que está compuesto por la proteína de unión al ADN LexA y el dominio transactivador VP16 del *Herpes virus* (Stagljär et al., 2002). Este factor al añadirle la proteína A de *Staphylococcus aureus* que contiene dos sitios de unión a IgG y facilita la detección de la proteína fusionada, da lugar al factor de transcripción híbrido CUB-PLV que será el utilizado en este trabajo.

Si existe interacción entre las proteínas estudiadas, se libera el factor de transcripción híbrido que migra al núcleo donde por medio de la unión de la proteína LexA al “promotor-operador *LexA*” se produce la activación de los genes reporteros (ej. *lacZ*, *HIS3*, etc.) (Figura 1.B). En cambio, cuando no se produce la interacción entre las proteínas la ubiquitina no se reconstruye y no se produce ni la liberación del factor de transcripción ni la expresión de los genes reporteros (Figura 1.A).

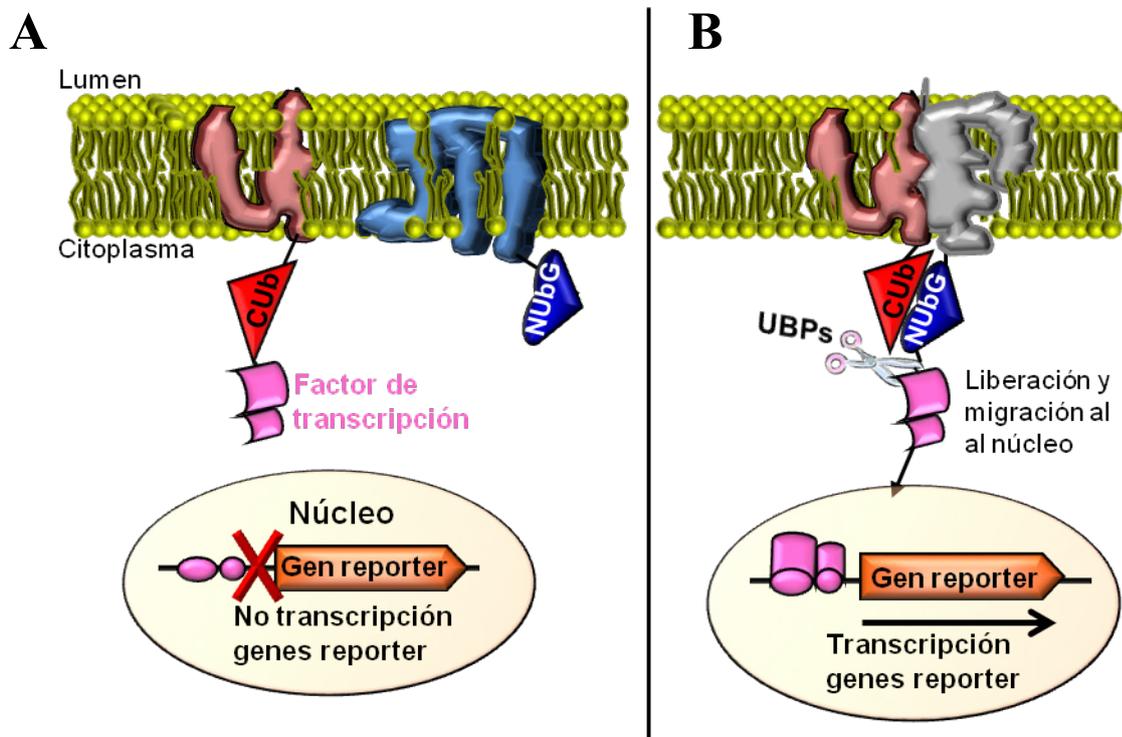


Figura 1. Sistema de la SU basado en el transactivador. A). No existe interacción proteica. B). Existe interacción entre las proteínas analizadas.

Las etiquetas CUB-TF y CUB-PLV son utilizadas exclusivamente para marcar proteínas de membrana. Así se impide que, a falta de liberación por las proteasas UBPs, los factores TF o PLV puedan difundirse hasta el núcleo y activar la expresión de los genes reporteros en ausencia de interacción.

El sistema de la SU ha sido usado para el análisis de transportadores de sacarosa, transportadores de potasio y Toc GTPasas en plantas (Reinders *et al.*, 2002; Obrdlik *et al.*, 2004; Rahim *et al.*, 2009); así como las interacciones de las proteínas del retículo endoplásmico en levaduras (Massaad *et al.*, 2001; Scheper *et al.*, 2003) o las interacciones de la presenilina, que es una proteína implicada en las etapas tempranas del Alzheimer en el hombre (Cervantes *et al.*, 2001).

I.3. REVISIÓN DE LOS PROBLEMAS EN EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES CON PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

Una característica de todas las células, tanto procariotas como eucariotas, es que poseen distintas estructuras membranosas que delimitan el citoplasma o lo compartimentalizan, dando lugar a los distintos orgánulos. La composición de estas membranas no es sólo lipídica sino que aproximadamente el 50% de su estructura está formada por proteínas que se denominan globalmente proteínas de membrana. Las proteínas de membrana representan una fracción importante de las proteínas totales y que, en el caso particular de *Arabidopsis thaliana*, supone el 30% (Schwacke *et al.*, 2003).

Las proteínas de membrana llevan a cabo o participan en una gran variedad de funciones como el transporte de sustancias a través de la membrana (proteínas transportadoras y canales iónicos), recepción y transducción de estímulos (proteínas receptoras o transceptoras), comunicación celular, catálisis enzimática, respiración, fotosíntesis o tráfico vesicular entre otros muchos procesos celulares (Lalonde *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Además, las proteínas de membrana son de gran interés en biomedicina ya que alrededor de un 50% de los fármacos están dirigidos contra este tipo de proteínas (Niegowski *et al.*, 2006).

A pesar de su relevancia, y debido a su peculiar estructura y a sus propiedades físico-químicas, las proteínas de membrana están menos estudiadas que las globulares y de una gran mayoría se desconoce su estructura y función. La estructura nativa básica de las proteínas de membrana se caracteriza por una gran superficie hidrofóbica que se encuentra en contacto con las cadenas alifáticas de los lípidos de membrana. En cambio, las regiones hidrofílicas son

más reducidas y están limitadas a pequeños segmentos que están en contacto con las cabezas polares de los lípidos y sobresalen de la membrana hacia espacios como el extracelular o el citoplasmático. En el caso particular de las proteínas que forman poros o transportadores, los residuos polares se encuentran en la parte interna de la proteína, donde coexisten con moléculas de agua, de forma que esta zona hidrofílica permite el transporte de sustancias a través de estas proteínas.

Debido a las extensas regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana, su estructura cuaternaria depende de su localización en membrana y de las interacciones específicas con los lípidos. Esta limitación estructural dificulta muchas aproximaciones experimentales, ya que cuando estas proteínas son extraídas de la membrana lipídica, experimentan una rápida desnaturalización y forman agregados como consecuencia de la exposición de sus superficies hidrofóbicas a los solventes acuosos (Pan *et al.*, 2010).

Las proteínas de membrana, al igual que las proteínas globulares, establecen conexiones con otras proteínas para poder realizar su correcta función. Sin embargo, a diferencia de las interacciones entre proteínas globulares, las interacciones entre proteínas de membrana están menos estudiadas y, por tanto, los interactomas de proteínas de membrana son más reducidos. Como se ha mencionado anteriormente, la escasez de datos es debida a características intrínsecas de las proteínas de membrana, especialmente su hidrofobicidad que dificulta su manipulación en solventes hidrofílicos. Su estructura también limita las áreas de interacción, que suelen implicar a interacciones entre segmentos transmembrana dentro de la membrana y a interacciones con proteínas solubles en las reducidas superficies polares (Xia *et al.*, 2006). Otro factor limitante reside en su reducida libertad de movimiento y en su restringida estructura, por estar embebidas en bicapas lipídicas, que limitan el número de posibles regiones de interacción y el contacto con otras proteínas. Por último, también influye la toxicidad que tiene la expresión de un gran número de proteínas de membrana en *E. coli* y que determina que los ORFs que codifican este tipo de proteínas estén infrarepresentados en las genotecas de expresión de ADNc (Frommer, Ninnemann., 1995; Tarassov *et al.*, 2008).

Algunas de las características descritas de las proteínas de membrana imposibilitan o dificultan el análisis de interacciones proteicas por métodos clásicos. Por ejemplo, el análisis de este tipo de interacciones por métodos *in vitro* o bioquímicos como la espectrometría de masas, la coimmunoprecipitación y la cristalografía de rayos X implica un tedioso proceso de optimización en el empleo de detergentes. Además, los detergentes utilizados para facilitar la solubilidad de las proteínas afectan en muchos de los casos a su correcta estructura o

conformación lo que imposibilita la formación de determinados complejos (Lalonde *et al.*, 2008). Por otro lado, la solubilización de estas proteínas mediante detergentes implica ajustar las condiciones para cada tipo de proteína siendo, por tanto, poco útil para estudios a gran escala (Miller *et al.*, 2005).

Para soslayar estos problemas, en numerosos casos se emplean únicamente los fragmentos solubles de las proteínas de membrana, más propensos a interacciones proteicas, eliminándose de esta forma las problemáticas partes hidrofóbicas y evitándose el uso de detergentes. Con el mismo fin, también se está avanzando en el desarrollo de membranas biosintéticas y en la optimización de los solventes.

Dados los inconvenientes que presentan los métodos de análisis *in vitro* de las interacciones de proteínas de membrana, las aproximaciones *in vivo*, como el sistema SU descrito anteriormente, pueden resultar más adecuadas y sencillas ya que permiten la localización de la proteína en la membrana y la conservación de su estructura nativa.

I.4. APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO A GRAN ESCALA DE LAS INTERACCIONES PROTEICAS.

En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo al análisis sistemático de interacciones proteicas a gran escala en una gran variedad de organismos, entre los que destacan los realizados en organismos modelo como *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* o el hombre (Uetz *et al.*, 2000; Gavin *et al.*, 2002, Ho *et al.*, 2002; Giot *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Barrios-Rodiles *et al.*, 2005; Butland *et al.*, 2005; Rual *et al.*, 2005; Gavin *et al.*, 2006; Krogan *et al.*, 2006; Arifuzzaman *et al.*, 2006; Ewing *et al.*, 2007; Tarassov *et al.*, 2008)

En plantas, los ensayos “ómicos” de interacciones proteicas se han realizado principalmente en *A. thaliana* y en el arroz.

La planta *A. thaliana* es organismo modelo versátil, bien desarrollado y ampliamente utilizado para estudios genéticos, bioquímicos y fisiológicos en plantas fanerógamas. Esta planta muestra un genoma pequeño totalmente secuenciado (114.5Mb/125Mb) (Theologis *et al.*, 2000), técnicas experimentales perfeccionadas que incluyen eficaces métodos de transformación, simples y baratas condiciones de cultivo y almacenamiento, corto ciclo de vida (6 semanas) y, por último, la conservación de la maquinaria celular básica de las plantas fanerógamas lo que permite la comparación de sus resultados con otras muchas plantas. Estas cualidades hacen que el uso de la planta *A. thaliana* sea recurrente en análisis experimentales.

Si se extrapolan los resultados del interactoma de *S. cerevisiae*, se puede estimar que las aproximadamente 30.000 proteínas de *A. thaliana* están implicadas en más de 75.000 interacciones proteicas (Morsy *et al.*, 2008). Sin embargo, los diferentes trabajos en los que se han analizado experimentalmente las interacciones proteicas de *A. thaliana* solamente han podido demostrar la existencia de menos de 7.000 interacciones (Obrdlik *et al.*, 2004; Van Leene *et al.*, 2007; Boruc *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Aunque los datos experimentales pueden ser complementados por los aportados por las diferentes estrategias computacionales, como por ejemplo las basadas en la existencia de interólogos (interacciones conservadas a través de las especies) que pueden predecir hasta más de 23.000 interacciones, el tamaño del interactoma descrito de *A. thaliana* está aún muy lejos de las previsiones (Geisler-Lee *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2008; De Bodt *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012). Este hecho demuestra que el desarrollo del interactoma de *A. thaliana*, y de forma más acusada la parte correspondiente a las proteínas de membrana, está aún en sus etapas iniciales y que es necesario el diseño y la aplicación de nuevos métodos tanto experimentales como computacionales esperando que los futuros datos aportados por aproximaciones “ómicas” cubran una mayor fracción del esperado o teórico número de interacciones de *A. thaliana* (Cusick *et al.*, 2005).

II. Objetivos

II.OBJETIVOS

El esclarecimiento del conjunto de las interacciones entre proteínas es de gran importancia para poder entender el funcionamiento de la maquinaria celular. Además, el estudio de los complejos proteicos facilita la comprensión de las funciones de las proteínas participantes en las interacciones al aportar información sobre su función, localización y regulación.

A pesar de su importancia, el grupo de las proteínas de membrana tiene una representación infraponderada en las redes de interacciones proteicas debido a las dificultades que presenta el trabajo con estas proteínas. Para aumentar la información sobre las interacciones de proteínas de membrana de la planta modelo *A. thaliana* en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Adecuar el análisis de interacciones de la Split Ubiquitin (SU) para su aplicación a gran escala construyendo nuevas cepas y nuevos plásmidos.
- Construir una colección de cepas transformantes de levadura que expresen un grupo seleccionado de proteínas de membrana de *A. thaliana* adecuadas para el análisis de interacción proteica mediante el ensayo SU.
- Realizar un ensayo piloto SU a gran escala con un grupo de 425 proteínas de membrana de la planta modelo *A. thaliana*.
- Análisis de los resultados obtenidos en el ensayo piloto SU a gran escala mencionado en el objetivo anterior.

III. Resultados

III. RESULTADOS

III.1. DESARROLLO DEL SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS DE LA “SPLIT UBIQUITIN” (SU) PARA SU USO A GRAN ESCALA.

El sistema de la SU es un método de gran utilidad para el estudio de interacciones entre proteínas con dominios transmembrana y ha sido aplicado a distintos tipos de organismos como levaduras, animales y plantas (Stagljar *et al.*, 1998; Reinders *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Este método fue diseñado originalmente para el análisis de las interacciones de un número limitado de proteínas y no está adaptado al análisis de un número elevado de proteínas como las que representan los estudios “ómicos”. Uno de los principales objetivos de este trabajo es el estudio a gran escala de las interacciones entre proteínas de membrana por lo que se procedió a la construcción de cepas de levaduras, plásmidos y el desarrollo de métodos de cuantificación de la especificidad de la interacción proteica que requiere la adaptación del método original de la SU a un nuevo método aplicable al análisis a gran escala.

III.1.1. Construcción de cepas para el sistema SU a gran escala.

Estudios previos realizados en *S. cerevisiae* en los que se ha utilizado el método de los dos híbridos para el análisis de interacciones proteicas a gran escala han demostrado la utilidad de emplear cepas diploides (Uetz *et al.*, 2000). Estas cepas diploides proceden de la fusión de dos cepas haploides, de forma que cada una de ellas es portadora de una de las proteínas en estudio fusionada a los dominios que las convierten bien en “cebo” (bait) o en “presa” (prey).

La formación de diploides, a partir de cepas haploides que expresan las proteínas cuya interacción se quiere determinar, permite analizar de forma sencilla un número muy elevado de proteínas mediante el apareamiento combinatorio de una colección de cepas haploides cebo con las de una colección de cepas haploides presa. Esta estrategia simplifica notablemente el método de ensayo al evitar que las cepas tengan que ser sometidas a dos transformaciones sucesivas como sucede en aproximaciones anteriores (Stagljar *et al.*, 1998).

Para poder aplicar esta estrategia se requiere que las cepas hospedadoras tengan las siguientes características:

- Las cepas portadoras de los vectores cebo y presa deben de tener apareamiento opuesto, α y α .

- Las cepas deben poseer las auxotrofías adecuadas (leu^- y trp^-) que permitan la selección de los vectores utilizados en el sistema SU diseñado en este trabajo.
- Las cepas han de tener delecionados los genes *HIS3* y *ADE2*, ya que serán utilizados como genes reporteros en los ensayos de interacción.
- La cepa portadora del vector cebo (Cub) debe tener integrados en el genoma los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y el gen bacteriano *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa. La expresión de estos genes reporteros deberá estar controlada por las secuencias del “promotor-operador *lexA*” de *E. coli*.

En el sistema de la SU que se ha diseñado para este trabajo, las interacciones proteicas provocan la liberación de un factor transcripcional artificial denominado PLV. Como ya se ha comentado en el apartado de “Introducción”, el factor PLV está compuesto por la fusión del dominio de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, que permite la detección de la proteína fusionada al contener dos sitios de unión de IgG, el dominio de activación transcripcional VP16 procedente de *Herpes virus* y la proteína *lexA*, de unión al ADN, que determina el reconocimiento específico y la unión a la secuencia del “promotor-operador bacteriano *lexA*”.

El uso de marcadores reporteros visibles sensibles a la interacción proteica facilita el análisis del escrutinio, especialmente cuando se trabaja con un número elevado de parejas proteicas. En este trabajo se han introducido en la cepa hospedadora de los vectores cebo tres genes reporteros: dos prototróficos (*lexA-HIS3* y *lexA-ADE2*), que permiten el crecimiento de las cepas en las cuales exista interacción proteica en medios selectivos, y uno que determina la síntesis de la enzima β -galactosidasa, cuya actividad puede ser detectada fácilmente “*in vivo*” mediante la hidrólisis de un substrato incoloro (X-gal) produciendo un compuesto característico de color azul. Partiendo de la cepa CEN.PK113-6B (Mata, *ura3-52*, *leu2-3,112*, *trp1-289*), se procedió al reemplazamiento de las secuencias promotoras de los genes *HIS3* y *ADE2* por la secuencia del “promotor-operador *lexA*”, de forma que la expresión de estos genes en la cepa resultante es dependiente del activador PLV (Figura 2).

Mientras que en ausencia del factor PLV la cepa es auxotrófica para histidina y adenina, la liberación de este factor, como resultado de una interacción proteica positiva, activa la transcripción de *HIS3* y de *ADE2* y permite el crecimiento de la cepa en un medio carente de estos requerimientos. Además del uso del gen *ADE2* como reportero de crecimiento, su actividad también puede ser detectada visualmente. En ausencia de expresión del gen *ADE2*, o en los mutantes *ade2*, las células acumulan un compuesto intermediario de la ruta biosintética de la adenina que da lugar a colonias con una coloración rojiza; mientras que la expresión del

gen evita la acumulación del compuesto, fosforibosilamino imidazol, y las células forman colonias de coloración normal blanca/crema.

También se ha añadido a la cepa portadora de los vectores cebo Cub un tercer gen reportero consistente en la secuencia codificante del gen *lacZ* controlado, como los anteriores, por las secuencias promotoras *lexA*. La actividad de este gen puede analizarse tanto cuantitativamente, mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa, como detectarse visualmente en un medio de cultivo sólido tratado con el sustrato cromogénico X-gal. Con el fin de no crear mutaciones adicionales, la integración del gen reportero *lacZ* se realizó mediante reemplazamiento del alelo mutante *trp1-289* presente en la CEN.PK113-6B, originando una cepa que fue denominada THY.AP4.

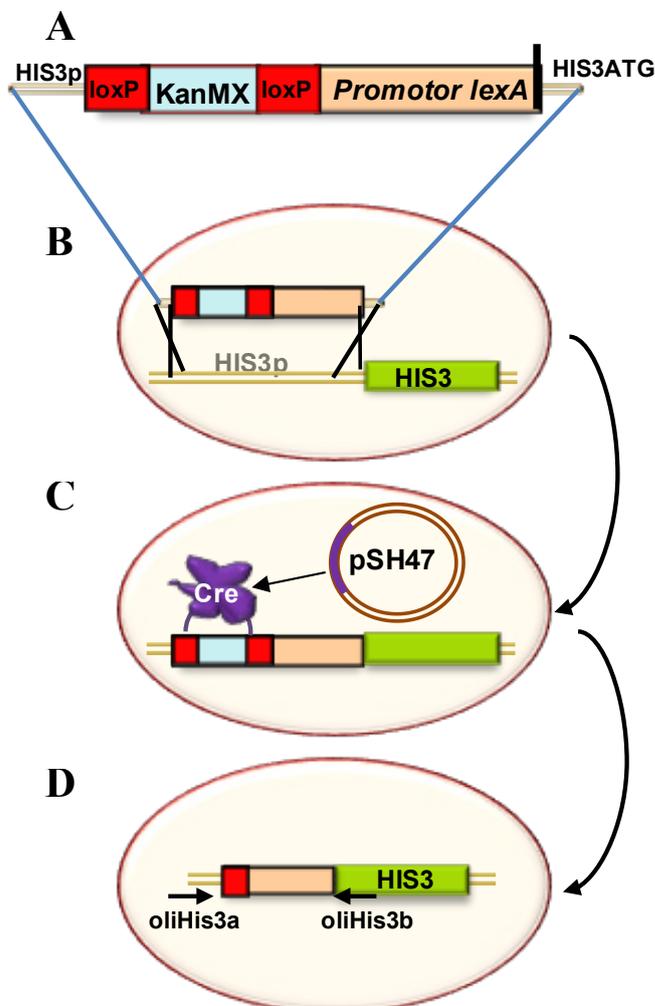


Figura 2. Construcción de la cepa portadora del gen reportero *lexA-HIS3*. A). Esquema del fragmento utilizado para el reemplazamiento del promotor *HIS3*. B). Reemplazamiento por recombinación *in vivo* del promotor *HIS3*. C). Eliminación del módulo *KanMX* por medio de la recombinasa Cre. Selección en un medio suplementado con geneticina. D). Selección de los transformantes que perdieron la resistencia a geneticina. Crecimiento en medio rico y selección en 5'FOA para seleccionar las cepas que han perdido el plásmido *pSH47*. Verificación de la construcción mediante la amplificación de la secuencia flanqueada por los oligonucleótidos His3a e His3b y secuenciación del amplicón obtenido.

Teniendo en cuenta que la estrategia SU requiere la formación de diploides, se decidió construir como cepa portadora de los vectores Nub una cepa *Mata α* , de tipo de apareamiento opuesto a la cepa THY.AP4 y que, además, presentara mutaciones auxotróficas que

permitiesen la selección tanto de los marcadores de los vectores Cub y Nub (*leu2* y *trp1* respectivamente) como mutaciones en los genes reporteros (*HIS3* y *ADE2*). Esta nueva cepa se obtuvo a partir de la cepa CEN.PK113-17D (*Mat α leu2-3,112, trp1-289, his3- Δ 1*) mediante la delección del gen *ADE2* por recombinación *in vivo* siguiendo un método similar al utilizado en el apartado anterior (ver “Materiales y Métodos”).

III.1.2. Diseño y construcción de los vectores necesarios para el sistema de la SU aplicado a gran escala.

El ensayo de interacción de proteínas a través de la reconstrucción de la ubiquitina requiere que las proteínas se encuentren fusionadas a los dominios N-terminal (Nub) y C-terminal (Cub) de la ubiquitina. La construcción de una amplia genoteca de proteínas fusionadas a cualquiera de los dos dominios solamente puede llevarse a cabo si se dispone de unos vectores adecuados que permitan que el proceso pueda ser realizado a gran escala y con un elevado grado de fiabilidad.

En el análisis de interacción de proteínas por el método de la SU, son necesarios al menos dos vectores: el primero de ellos con la secuencia que codifica para el polipéptido correspondiente al extremo amino de la ubiquitina (Nub) y el segundo que contiene la secuencia codificante del extremo carboxilo de la ubiquitina (Cub) y debe estar fusionada a la secuencia que codifica el factor PLV responsable de la activación de los genes reporteros cuando existe interacción proteica.

Para facilitar la clonación de una gran cantidad de genes de una manera rápida y efectiva se ha dotado a todos los vectores utilizados en este trabajo de unas secuencias recombinogénicas comunes denominadas B1 (acaagttgtacaaaaagcaggctctccaaccacc) y B2 (tccgccaccaccaaccactttgtacaagaaagctgggta) que flanquean al casete *KanMX* y que contienen los sitios *attB1* y *attB2* (respectivamente) del sistema de clonación Gateway (Invitrogen). La presencia de las secuencias B1 y B2 en los vectores permite clonar genes flanqueados por estas mismas secuencias mediante recombinación *in vivo* en la levadura.

Para la construcción de vectores Nub, responsables de la expresión de las proteínas fusionadas al extremo amino de la ubiquitina, se partió de los plásmidos episómicos pNubG-ALG5 y pOST1-NubG (Stagljar *et al.*, 1998). Según se describe con detalle en “Materiales y Métodos”, las regiones correspondientes a los genes *ALG5* y *OST1* de estos plásmidos fueron sustituidas por el marcador de resistencia *KanMX*, a su vez flanqueado por las secuencias

recombinogénicas B1 y B2, dando origen respectivamente a los vectores pNXgate y pXNgate (Figura 3). Mientras que el vector pNXgate determina la producción de una proteína de interés que contiene el dominio Nub en su extremo amino, el vector pXNgate permite la síntesis de proteínas de interés que contienen el dominio Nub en su extremo carboxilo.

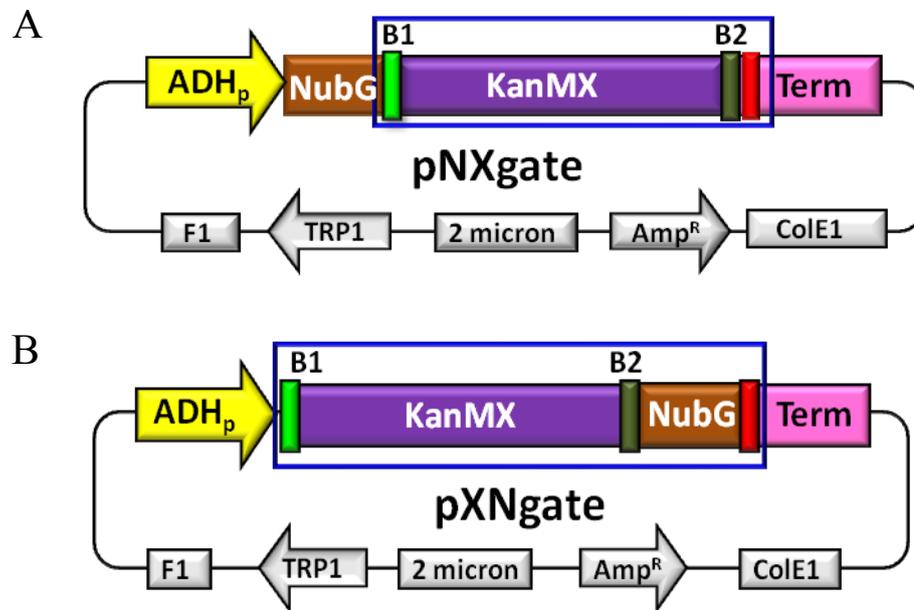


Figura 3. Vectores que fusionan el extremo amino de la ubiquitina (Nub). Ambos vectores llevan en módulo de resistencia a G418 y las secuencias recombinogénicas B1 y B2. A). Vector pNXgate fusiona la secuencia Nub al extremo amino de la proteína de interés. B). Vector pXNgate fusiona la secuencia Nub al extremo carboxilo de la proteína de interés.

Para la construcción de los vectores Cub se tuvieron en cuenta ensayos previos en los que se aplicó a pequeña escala el sistema de la SU y en los que se comprobó que los resultados diferían dependiendo del tipo de promotor que se utilizaba para controlar la expresión de las proteínas fusionadas al dominio Cub-PLV. Así, la baja expresión de la proteína genera una cantidad insuficiente de activador PLV que induce una expresión muy limitada de los genes reporteros (*lacZ*, *HIS3*, *ADE2*) incluso en el caso de proteínas que interactúan específicamente y, por consiguiente, provoca la aparición de falsos negativos. Por el contrario, una expresión elevada de la proteína portadora del dominio Cub-PLV determina un incremento en la detección de interacciones no específicas (falsos positivos) que probablemente sea debida a una acumulación excesiva de proteína en los orgánulos o sistemas de membranas, principalmente RE y aparato de Golgi, que, a su vez, propiciaría interacciones inespecíficas y la consiguiente liberación del activador PLV.

Como los niveles de expresión de la proteína portadora del dominio PLV pueden alterar la calidad de los ensayos de interacción SU, se abordó la construcción de vectores Cub con promotores regulables que permitiesen establecer unos niveles de expresión idóneos para minimizar las interacciones inespecíficas (falsos positivos) sin comprometer la detección de interacciones específicas (falsos negativos) que requieran una expresión elevada de la proteína portadora del dominio PLV.

Se han construido dos vectores que difieren en el promotor regulable y que presentan las siguientes características comunes:

- Son vectores centroméricos que determinan una única copia por célula para evitar que un mayor número de copias altere artificialmente la expresión de la proteína a ensayar.
- Presentan el gen *LEU2* como marcador de selección en las células transformantes de la cepa THY.AP4.
- Como los vectores pXNgate y pNXgate, contienen el marcador *KanMX* flanqueado por las secuencias recombinogénicas B1 y B2. Estas secuencias facilitan la clonación de las secuencias codificantes de los genes a ensayar mediante recombinación *in vivo* en la levadura. La correcta inserción de la secuencia codificante del gen la sitúa en la misma fase de lectura que la secuencia que codifica la región Cub-PLV.

Los dos vectores construidos difieren en el promotor regulable que controla la expresión de la proteína de fusión con el dominio Cub-PLV en el extremo C-terminal.

El primero, denominado TET-Cub, contiene el promotor híbrido tet_p , formado por la secuencia promotora bacteriana *tetO* y las secuencias TATA y líder del gen *CYCI* de *S. cerevisiae* (Garí *et al.*, 1997) (Figura 4.A). El promotor tet_p es activado por el transactivador tTA, que está incluido en el mismo vector, y se expresa constitutivamente por la acción del promotor humano CMV (cytomegalovirus). En presencia de tetraciclina, o ciertos derivados como la doxiciclina, el transactivador tTA es incapaz de unirse y activar al promotor tet_p , impidiendo la expresión de la secuencia bajo su control. De esta forma, la expresión de la proteína bajo el control de este promotor es reprimida de forma lineal en respuesta a concentración de doxiciclina añadida al medio de cultivo (Garí *et al.*, 1997).

El segundo vector construido, denominado pMetYCgate, porta el promotor del gen *Met25* que codifica una de las enzimas (*O*-acetyl homoserina sulfhidrolasa) implicadas en la biosíntesis de metionina. La actividad del promotor *Met25* es reprimida por metionina por lo

que la expresión de los genes colocados bajo su control puede ser controlada mediante la adición de diferentes concentraciones de este aminoácido al medio de cultivo (Figura 4.B).

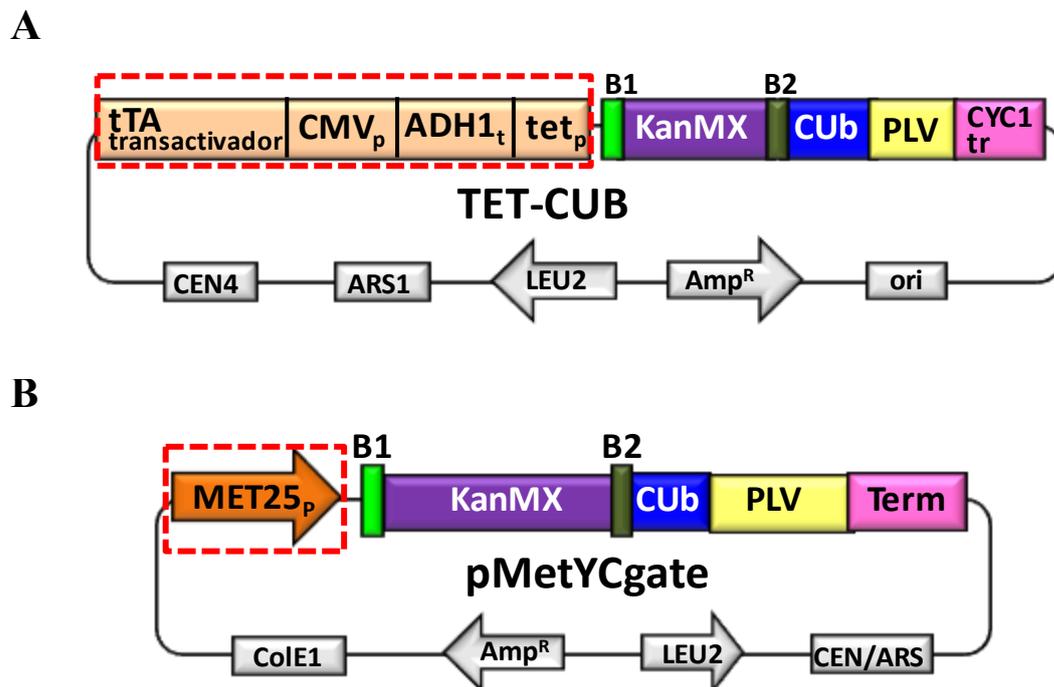


Figura 4. Vectores que fusionan el dominio Cub. Se enmarca en rojo los promotores reprimibles que lleva cada uno de los plásmidos. A). Vector TET-Cub con un promotor híbrido reprimible por doxiciclina. Está formado por el transactivador *TA-CMVpromotor* (Gossen, Bujard., 1992), la secuencia terminadora *ADH1_t*, el promotor *tet* compuesto por siete repeticiones del promotor *tetO* (Gossen, Bujard., 1992) y la secuencia *CYCITATA* (Cesareni, Murray.,1987). B). Vector pMetYCgate con el promotor *Met25* reprimible por metionina.

Con el fin de verificar el correcto mecanismo de regulación de expresión de los vectores TET-Cub y pMetYCgate se realizaron ensayos Western blot de extractos proteicos totales. Para llevar a cabo esta comprobación se utilizó el gen *WBP1* de *S. cerevisiae* que codifica para la subunidad β del complejo glicoproteico de la oligosacaril transferasa.

Utilizando como molde ADN genómico de la levadura y oligonucleótidos específicos, que agregan las secuencias recombinogénicas B1 y B2, se amplificó la secuencia codificante de este ORF; la cual se clonó en los vectores en análisis mediante un proceso de recombinación *in vivo* en la levadura THY.AP4. Se obtuvieron, de este modo, las cepas TET-WBP1-Cub y Met-WBP1-Cub que fueron cultivadas en medios suplementados con diferentes concentraciones del metabolito represor (doxiciclina en el caso del vector TET-Cub y metionina en el caso del vector pMetYCgate).

Utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína VP16 se pudo comprobar que en ausencia de represor ambas cepas muestran una expresión muy abundante de la proteína WBP1-CubPLV de 101 kDa (Figura 5.A, B). Como era de esperar, la abundancia de esta proteína disminuye gradualmente a medida que aumenta la concentración del represor, de forma que a una concentración de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina o 250 μM de metionina se reduce casi un 90% la cantidad de WBP1-CubPLV.

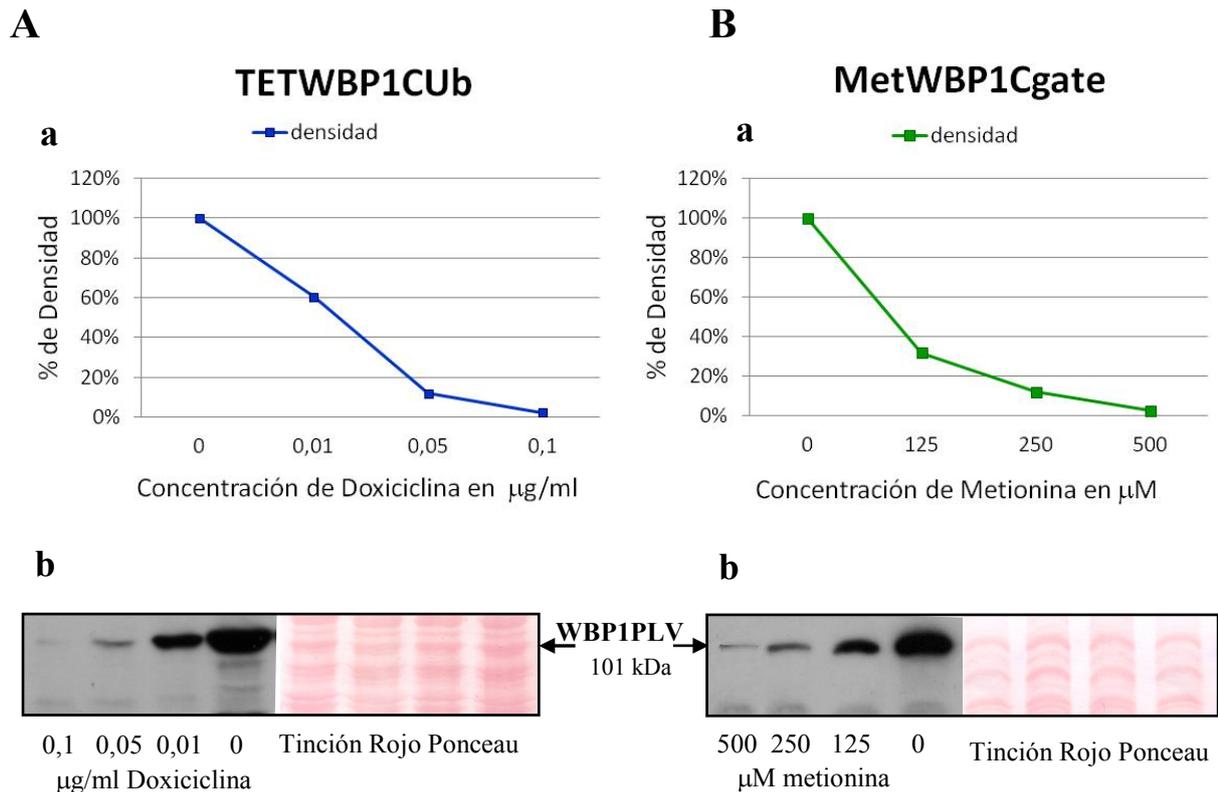


Figura 5. Análisis de la capacidad de represión de los plásmidos Cub mediante Western blot. La concentración proteica aparece representada en las tinciones de Rojo Ponceau. A). Represión de la expresión de la proteína de fusión WBP1-Cub controlada por el promotor *TET*. Aa). Cuantificación de la expresión proteica a distintas concentraciones de doxiciclina. Ab). Western blot de la expresión de WBP1-Cub a distintas concentraciones de doxiciclina. B). Represión de la expresión de la proteína de fusión WBP1-Cub controlada por el promotor *Met25*. Ba). Cuantificación de la expresión proteica a distintas concentraciones de metionina. Bb). Western blot de la expresión de WBP1-Cub a distintas concentraciones de metionina. Densidad: La intensidad total de todos los píxeles en el volumen seleccionado dividido por el área de ese volumen.

III.1.3. Análisis y comprobación de los vectores y cepas construidos.

Para comprobar la eficacia de los vectores y cepas construidos para el ensayo SU se utilizaron como controles los genes *OST1* y *WBP1* de *S. cerevisiae*. Estos genes codifican proteínas localizadas en la membrana del retículo endoplásmico (RE) y forman parte del complejo de nueve subunidades que componen la oligosacariltransferasa en la levadura. La

interacción de estas dos subunidades de la oligosilacariltransferasa ha sido demostrada en varios trabajos basados en diferentes estrategias experimentales de análisis de interacción de proteínas (Pathak *et al.*, 1997; Stagljar *et al.*, 1998; Gavin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Scheper *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003).

Tras amplificar la secuencia codificante del gen *OST1* con oligonucleótidos que añaden las secuencias recombinogénicas B1 y B2 en sus extremos, el amplicón resultante fue clonado en los vectores pNXgate y pXNgate por recombinación *in vivo* en la cepa de levadura THY.AP5. Este proceso da lugar a cepas que son portadoras de los plásmidos pNub-OST1 y pOST1-Nub y expresan, respectivamente, las proteínas de fusión Nub-OST1 y OST1-Nub (la nomenclatura Nub-OST1 / OST1-Nub determina la posición del dominio Nub en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína OST1). Siguiendo la misma estrategia, se obtuvieron las cepas TET-WBP1-Cub y Met-WBP1-Cub. Estas cepas son portadoras de los plásmidos recombinantes pTET-WBP1-Cub y pMet-WBP1-Cub y expresan la proteína WBP1-Cub, que posee el dominio C-terminal de la ubiquitina (Cub) en su extremo C-terminal. Aplicando el sistema SU se ha demostrado que las proteínas control dan resultados positivos solamente cuando el dominios Nub y Cub se encuentran fusionados al extremo carboxilo de OST1 o WBP1 ya que el extremo amino de estas proteínas no tiene una localización citosólica (Stagljar *et al.*, 1998).

Tras la formación de diploides entre las cepas que expresan la proteína WBP1-Cub, bajo el control del promotor tet_p o el promotor *Met25*, y las cepas que expresan las proteínas Nub-OST1 y OST1-Nub, se procedió a su selección en medio mínimo (SD-trp-leu) y, a continuación, se sembraron en diluciones seriadas en los medios selectivos adecuados que permiten determinar la expresión de los genes reporteros.

Cuando los diploides formados por la cepa TET-WBP1-Cub fueron sembrados en medio SD para determinar si existe expresión de los genes reporteros *HIS3* y *ADE2*, se observó que no solamente mostraban crecimiento los dos ensayos OST1-Nub y Nub-OST1 sino también el control positivo WT2 y los controles negativos XNgate y NXgate. La presencia de diferentes concentraciones de doxiciclina en el medio de cultivo para disminuir la expresión de la proteína WBP1-Cub tampoco logró aumentar la especificidad del ensayo no encontrándose una concentración que fuese capaz de discriminar entre la capacidad de crecimiento del control positivo y la incapacidad de crecimiento que deben mostrar los controles negativos (Figura 6.A). También se obtuvieron los mismos resultados cuando se analizó el color de las

colonias, como resultado de la expresión del gen *ADE2*, o el ensayo de la actividad β -galactosidasa (Figura 6.B y 6.C).

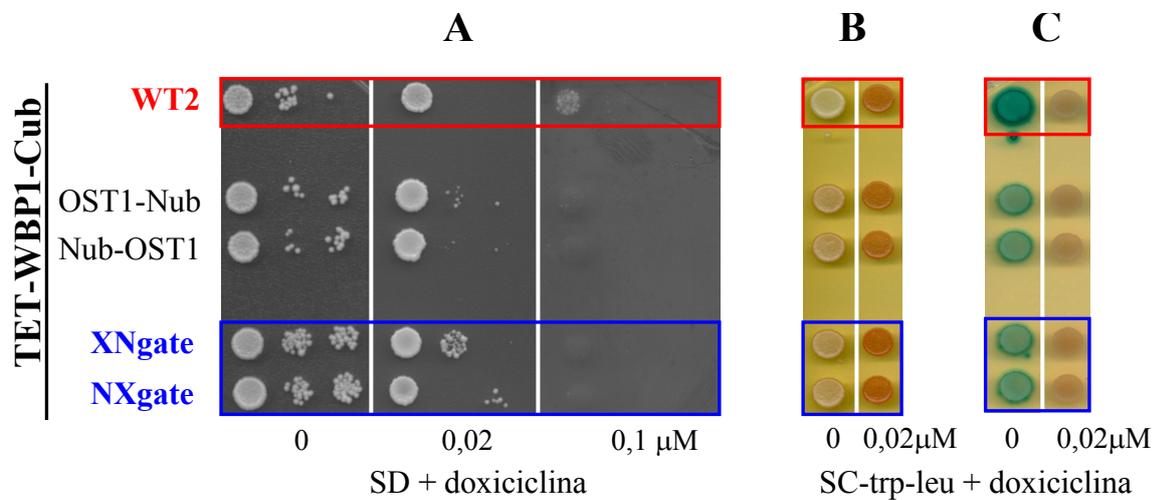


Figura 6. Ensayo de la SU con el vector TET-Cub. A). Crecimiento en medio sólido sin histidina y sin adenina. B). Análisis de la expresión del gen *ADE2*. Las colonias blanquecinas implican la interacción entre las proteínas ensayadas, mientras que las colonias rojizas no. C). Resultados obtenidos tras el ensayo de la β -galactosidasa. La coloración azul significa interacción mientras la blanca representa la no interacción. Control positivo formado por la cepa TET-WBP1-Cub y la cepa WT2. Controles negativos formados por los diploides TET-WBP1-Cub con los plásmidos Nub vacíos.

Por tanto, los resultados obtenidos con el plásmido TET-WBP1-Cub no permiten distinguir entre las interacciones proteicas reales y las inespecíficas y tampoco confirman los resultados publicados que describen la interacción proteica entre las proteínas WBP1 y OST1.

El mismo tipo de análisis también fue realizado con los diploides formados con la cepa Met-WBP1-Cub, en la que la expresión de la proteína WBP1-Cub está bajo el control del promotor reprimible por metionina *Met25*. A diferencia de los resultados obtenidos con el vector TET-Cub, los ensayos realizados con el vector pMetYCgate son acordes con los resultados esperados (Figura 7).

Los controles negativos XNgate y NXgate, consistentes en los diploides que expresan la proteína Met-WBP1-Cub con el dominio Nub soluble que expresan las cepas que llevan los plásmidos Nub vacíos, son incapaces de crecer en medio carente de histidina y de adenina debido a que los genes *HIS3* y *ADE2* no son transcripcionalmente activos. Por el contrario, el control positivo WT2, que expresa las proteínas Met-WBP1-Cub y el dominio Nub de la ubiquitina silvestre, muestra crecimiento en medio SD incluso a concentraciones de metionina (250 μM) que reducen un 90% la expresión de Met-WBP1-Cub. Además, mientras que la

cepa OST1-Nub en la que el dominio Nub de la proteína se encuentra en el citoplasma y muestra crecimiento debido a la interacción con el dominio citoplasmático Cub, las cepas Nub-OST1 no son capaces de crecer porque en este caso la localización del dominio Nub está en el lumen del RE y no puede interactuar con el dominio citoplasmático Cub (Figura 7.A).

Los resultados de la interacción basados en los ensayos de crecimiento son corroborados cuando se analiza la coloración de las cepas determinada por la activación del gen reportero *ADE2*. Así, las cepas Met-WBP1-Cub/WT2 y Met-WBP1-Cub/OST1-Nub muestran un color blanquecino correspondiente a la activación de la expresión del gen y, por consiguiente, la existencia de interacción entre ambas proteínas. Por el contrario, las cepas que expresan proteínas que no interactúan (Met-WBP1-Cub/XNgate, Met-WBP1-Cub/NXgate y Met-WBP1-Cub/Nub-OST1) presentan el color rojizo típico de la inactivación del gen reportero *ADE2* (Figura 7.B). Igualmente, el gen reportero *lacZ* discrimina claramente los diploides con interacción proteica positiva y, por consiguiente presentan colonias de color azul derivado de su actividad β -galactosidasa, de aquellos diploides que no presentan interacción (Figura 7.C).

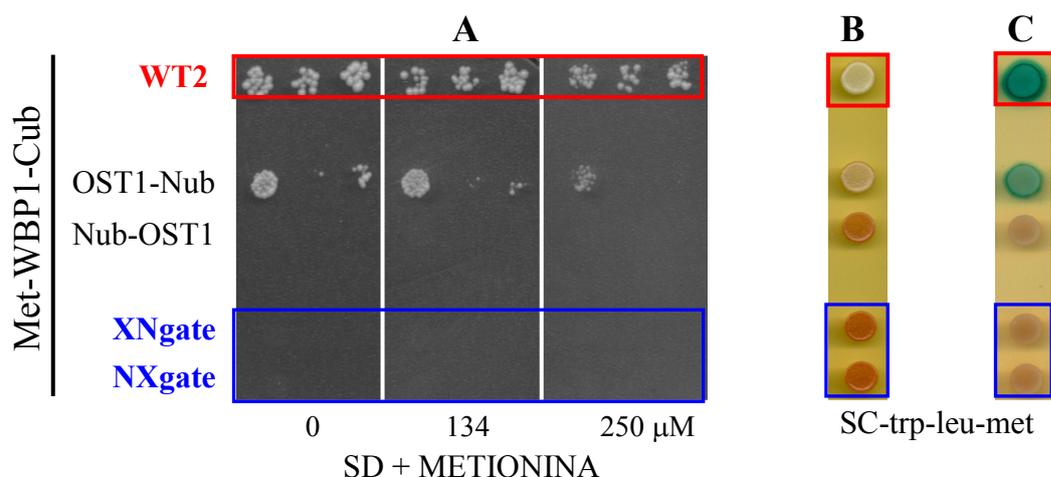


Figura 7. Ensayo de la SU con el vector MetYCgate. A). Crecimiento en medio selectivo sólido sin histidina y sin adenina. B). Análisis de la expresión del gen *ADE2* mediante el color de los diploides. C). Resultados obtenidos tras el ensayo de la β -galactosidasa. Control positivo formado por la cepa Met-WBP1-Cub y la cepa WT2. Controles negativos formados por los diploides Met-WBP1-Cub con los plásmidos Nub vacíos.

La comparación de los resultados con los vectores TET-Cub y pMetYCgate pone de manifiesto la importancia del promotor y el sistema de regulación de la expresión del dominio Cub-PLV en el sistema de escrutinio de interacción de proteínas SU. Aunque no está claro el motivo por el que solamente uno de los sistemas, el basado en el promotor *Met25*, es capaz de discriminar la existencia de interacción proteica específica entre las proteínas modelo WPB1

y OST1, es posible que los niveles de expresión basales, característicos de cada promotor, puedan ser determinantes.

En cualquier caso, dado que el vector pMetYCgate permite la detección de interacción específica de las proteínas utilizadas como modelo en un amplio rango de niveles de expresión fue escogido para la realización de los escrutinios a gran escala de este trabajo.

III.2. INTERACTOMA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN *A. THALIANA*.

Este trabajo está englobado en un proyecto financiado por la UE que tiene como título “Associomics of Membrane Proteins in Two Model Organisms, yeast and *Arabidopsis*”. En él se pretende analizar el interactoma de proteínas de membrana de dos organismos modelos *A. thaliana* y *S. cerevisiae* por el método de interacciones proteicas de la SU.

Previamente al análisis de las más de 6000 proteínas de membrana que tiene la planta *A. thaliana* se realizó el estudio piloto desarrollado en este trabajo. Este estudio abarca principalmente proteínas que se predicen como transportadores de membrana, receptores o proteínas reguladoras relacionadas con proteínas de membrana que puedan interactuar entre sí modificando y/o controlando el tránsito molecular y la recepción de señales a través de las membranas.

Dentro del gran número de proteínas de este tipo que existen en *A. thaliana* se seleccionaron proteínas que son codificadas por secuencias inferiores a 4500 pb que no presentasen dificultades en su amplificación. Además, estas proteínas debían ser adecuadas para el ensayo de la SU, eliminándose aquellas que de forma predictiva no presentasen alguno de sus dos extremos localizados en el citoplasma. Finalmente, el estudio piloto se llevó a cabo con un total de 425 proteínas de *A. thaliana* (Figura 8) entre las cuales se identificaron y analizaron las distintas interacciones empleando una estrategia “*high-throughput*”.

Estas 425 proteínas forman un grupo heterogéneo como se presenta en la figura 8, donde se muestra la clasificación de estas proteínas empleando el programa Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2000) existente en la base de datos de *A. thaliana* TAIR denominado GO Slim Classification for Plants que permite determinar de manera general la función molecular, la localización y el proceso biológico en que están involucradas las proteínas.

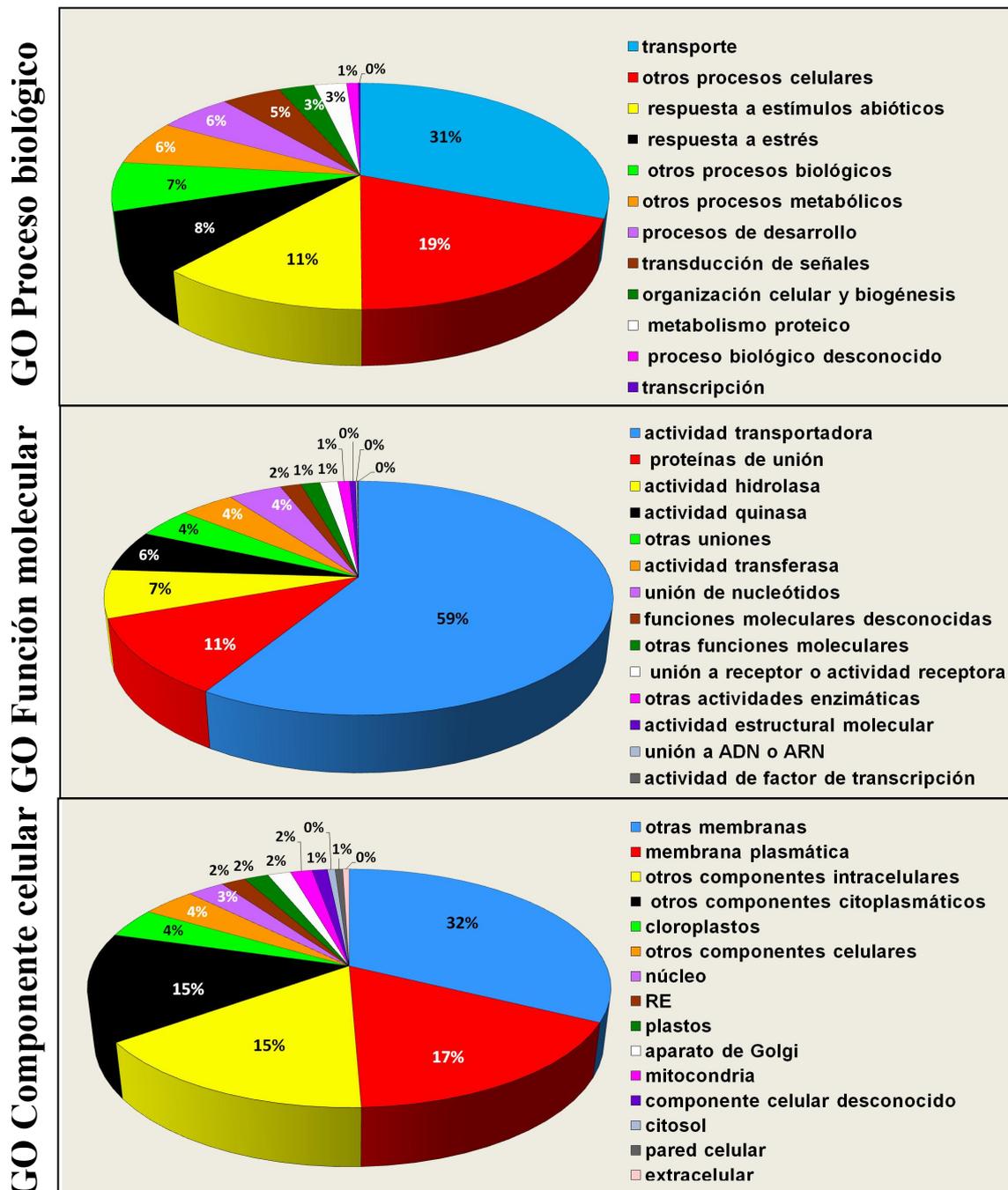


Figura 8. Caracterización del grupo proteico utilizando el programa GO Slim Classification for Plants (base de datos TAIR).

Este análisis muestra que en el grupo proteico seleccionado existe un predominio de proteínas transportadoras, con un porcentaje superior al 50%. También destacan las proteínas que participan en procesos biológicos relacionados con mecanismos o rutas de transporte (30%) junto a la recepción de estímulos abióticos (11%). Por último, el análisis del componente celular al que pertenecen estas proteínas confirma que la gran mayoría son proteínas de membrana aunque su distribución refleja el conjunto de orgánulos y sistemas de

membranas existentes en la célula (mitocondrias, cloroplastos, núcleo, Golgi, etc.), no obstante su localización prevalente es la membrana plasmática.

También se procedió a analizar las propiedades estructurales de cada una de las proteínas seleccionadas para predecir si correspondían a proteínas de membrana o proteínas solubles, ya que el ensayo SU requiere que el factor transcripcional PLV esté fusionado a una proteína asociada a la membrana para evitar su posible difusión al núcleo (Stajlar *et al.*, 2003).

La base de datos ARAMEMNON es una herramienta muy útil para la predicción estructural de proteínas ya que utiliza 18 programas individuales para el pronóstico de dominios α -transmembrana (Alom_v2, ConPred_v2, DAS-TMfilter, HmmTop_v2, MemSat_v3, Minnou, PHDhtm, Phobius, PredTmr_v1, S-Tmhmm_v0.9, Scampi, SosuiG_v1.1, SVMtm_v3, THUMBUP_v1, TMap, TmHMM_v2, TMMOD, TmPred, TopPred_v2), 6 programas para la detección de dominios β -transmembrana (BOMP, MCMBB, TMB-hunt, TMBeta-net, TMBpro, transFold) así como una serie de programas específicos para la detección de proteínas ancladas a membrana por grupos glicosil-fosfatidilinositol (GPI), motivos de miristolización y grupos prenilación o de palmitoilación (big-PI, FragAnchor, GPI-SOM, PredGPI, PrePS-FT, PrePS-GGT-Caax, PrePS-GGT-Rab, NMT, PlantsP_Myr, TerminiNator) (Schwacke *et al.*, 2003).

La aplicación de las herramientas de ARAMEMNON al grupo de proteínas seleccionado para el ensayo confirmó que la mayoría (349 de 425) pueden ser consideradas proteínas de membrana con una alta probabilidad ya que presentan claras secuencias hidrofóbicas que se pronostican como dominios transmembrana y, por tanto, son aptas para la fusión al dominio PLV; mientras que 76 proteínas o bien son proteínas solubles o su predicción topológica es controvertida (Figura 9).

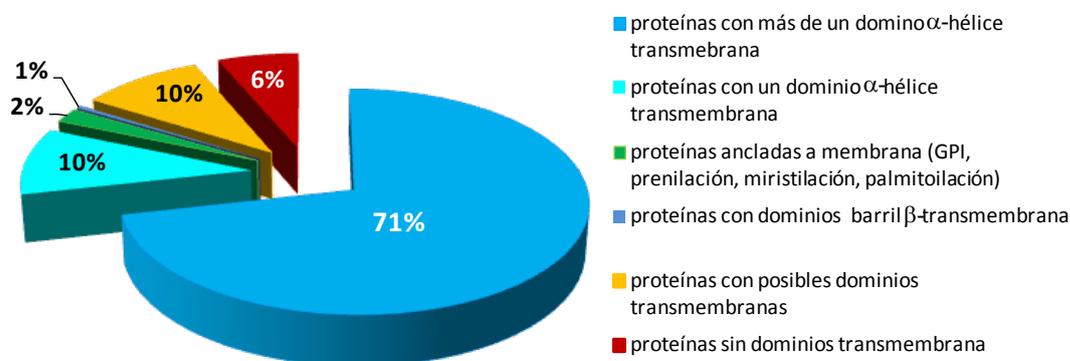


Figura 9. Clasificación de las proteínas en base de sus dominios transmembrana. Se utilizó la base de datos ARAMEMNON.

La caracterización topológica de las proteínas seleccionadas para el ensayo muestra la presencia de un pequeño grupo de proteínas solubles (27), estas son proteínas relacionadas con la transducción de señales y es muy probable que interaccionen con proteínas de membrana. Las proteínas solubles pertenecen mayoritariamente a dos grupos proteicos el de las anexinas y el de las calmodulinas o proteínas relacionadas con estas últimas. Ambos grupos están estrechamente relacionados con las membranas celulares, ya que las proteínas anexinas tienen la capacidad de unirse a los fosfolípidos de membrana cuando existe una alta concentración de iones calcio y las calmodulinas y proteínas relacionadas son capaces de interaccionar con muchas clases de proteínas de membrana como los miembros de la familia CNGC, MLO, transportadores de potasio y otros (Yang *et al.*, 2003).

III.3. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS TRANSFORMANTES DE *S. CEREVISIAE* PORTADORAS DEL EXTREMO AMINO Y CARBOXILO DE LA UBIQUITINA.

Una vez seleccionado el grupo de proteínas objeto de estudio se procedió a la amplificación de los ORFs correspondientes, su verificación y su clonación en los vectores del sistema SU. La clonación de un elevado número de fragmentos requiere el uso de estrategias que simplifiquen el proceso y proporcionen una elevada eficacia, seleccionándose, por este motivo, la recombinación *in vivo* en *S. cerevisiae* que permite, mediante una simple transformación, obtener los clones deseados en las cepas adecuadas para el ensayo SU. Para hacer factible este método los ORF amplificados estaban flanqueados por las secuencias B1 y B2 homólogas a las que existen en todos los plásmidos utilizados. El diseño de los oligonucleótidos que amplifican los genes y añaden las secuencias B1 y B2 ha sido descrito más detalladamente en “Materiales y Métodos”.

Utilizando estos cebadores específicos se realizaron las correspondientes reacciones de amplificación siendo el molde empleado ADNc obtenido a partir de ARN de *A. thaliana* de la variedad Col0.

Después de la amplificación cada muestra fue analizada por electroforesis para comprobar si su tamaño era correcto y estimar su concentración; repitiéndose las amplificaciones cuya concentración no fuera adecuada para su posterior clonación. Para estimar la fiabilidad del proceso de amplificación a gran escala, se secuenció aproximadamente un 10% de las secuencias obtenidas en el proceso de amplificación comprobándose que un 94% de las reacciones correspondían al ORF que se deseaba amplificar y la secuencia era correcta.

Como resultado del análisis del tamaño de las amplificaciones obtenidas y de las reacciones de secuenciación se eliminaron 12 clones que no presentaban el tamaño o la secuencia adecuada y se continuó el trabajo con 413 ORFs.

Una vez obtenidas las amplificaciones de los genes de *A. thaliana* se transformaron las cepas THY.AP5 y THY.AP4 con los plásmidos linearizados pXNgate y pMetYCgate, respectivamente, y con los amplicones de los genes para obtener las cepas transformantes por recombinación *in vivo* tal y como se esquematiza en la Figura 10.

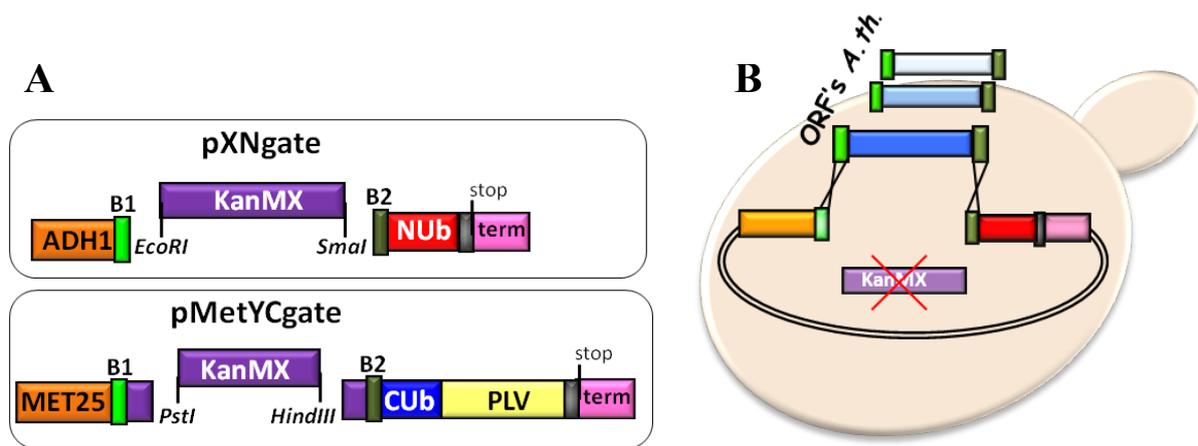


Figura 10. Obtención de cepas transformantes para el ensayo SU a gran escala. A). Digestión de los plásmidos utilizados. B). Proceso de recombinación *in vivo* de las secuencias recombinogénicas B1 y B2.

Tanto el proceso de recombinación *in vivo* como las reacciones de transcripción reversa y, principalmente, las de PCR, llevadas a cabo para la amplificación y clonación de los ORFs, tienen efectos mutagénicos indeseados que pueden afectar a la expresión o función de las proteínas codificadas. Con el propósito de minimizar este efecto mutagénico, en lugar de seleccionar una única colonia transformante, sensible a G418, se seleccionaron grupos de 20-50 colonias transformantes para representar un determinado ORF. Así, mediante el uso de un grupo o “pool” de transformantes para cada ORF se elimina teóricamente la posibilidad de que todos los transformantes sean portadores de mutaciones y ninguno exprese la proteína correcta (Petracek *et al.*, 2002).

Para comprobar que cada “pool” de transformantes era portador del ORF correcto se analizó mediante PCR el tamaño de su inserto. Además, también se comprobó mediante secuenciación de los amplicones obtenidos en las PCRs analíticas que en los “pools” analizados prevalece la secuencia de ADN correcta, idéntica a la depositada para el correspondiente ORF en las bases de datos de *A. thaliana*.

En resumen, tras el proceso de construcción y análisis de los “pools” de transformantes se obtuvieron 413 “pools” de transformantes de la cepa THY.AP5 portadores de diferentes ORFs en el plásmido pXNgate y 173 “pools” de transformantes de la cepa THY.AP4 portadores de ORFs en el plásmido pMetYCgate.

A continuación, los “pools” de transformantes verificados fueron cultivados en medio líquido en placas multipocillos tipo “deep-well” de 96 pocillos (5 placas de transformantes X-Nub y 3 placas de transformantes Y-CUb) y replicados para obtener una serie de placas que fueron almacenadas a -80°C en presencia de 25% glicerol. Debido a que los ensayos preliminares mostraron que los resultados son más reproducibles cuando se parte de cultivos frescos, las réplicas almacenadas fueron replicadas periódicamente consiguiendo obtener resultados más homogéneos.

III.4. ENSAYO DE INTERACCIÓN “SPLIT UBIQUITIN” DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

En el ensayo SU a gran escala se emplearon como “cebo” las cepas Cub, de forma que fueron utilizadas para formar diploides con cada una de las cepas “presa”, la colección de cepas transformantes Nub. En los diploides así construidos se analizó si existe activación de dos de los genes reporteros (*ADE2* e *HIS3*) determinando su capacidad de crecimiento en medio mínimo líquido y en el mismo medio suplementado con 250 μ M de metionina. La adición de metionina al medio permite seleccionar aquellas interacciones más específicas, siendo de gran utilidad en los casos de las cepas cebo que presentan un gran número de interacciones inespecíficas en el medio carente de metionina. La capacidad de crecimiento determinada cuantitativamente a través de la DO_{595} del cultivo puede establecer unos parámetros de ausencia o existencia de interacción objetivos que no estén sujetos a la subjetividad del tamaño de las colonias en medio sólido. Un ejemplo de estos resultados se representa en la Tabla 1 donde se muestra la disposición de los valores de crecimiento (DO_{595}) y queda reflejado el comportamiento de distintos clones respecto a los controles positivo y negativo así como el de diferentes parejas de proteínas en unas condiciones específicas de tiempo de cultivo y concentración de metionina.

III.4.1. Análisis del comportamiento de los controles en el análisis a gran escala.

En los ensayos a gran escala es imprescindible el análisis de los resultados obtenidos con los controles, tanto positivos como negativos, para poder estimar la fiabilidad del método empleado.

En este trabajo se utilizaron tres tipos de controles distintos:

- Controles de contaminación consistentes en pocillos sin células. La presencia de crecimiento en estos controles revela la existencia de posibles contaminaciones que pueden tener lugar durante el proceso experimental.
- Controles negativos consistentes en pocillos que contienen células portadoras del vector vacío pXNgate. Este control permite eliminar aquellos clones que, bien expresan proteínas Y-Cub que se autoprocésan liberando el factor PLV sin unirse al fragmento Nub o bien muestran interacciones transitorias inespecíficas dando lugar a un elevado número de falsos positivos.

- Controles positivos consistentes en pocillos que contienen la cepa transformante que expresa el extremo soluble Nub de la ubiquitina de tipo silvestre. El extremo Nub silvestre debe interactuar con el extremo Cub sin necesidad de que exista interacción entre las proteínas a las que están fusionados. Por tanto este tipo de control permite detectar aquellas proteínas Cub que por causas conformacionales no son aptas para el análisis SU.

Estos dos últimos controles son los que realmente permiten analizar la especificidad del ensayo y son analizados a continuación.

III.4.1.a. Análisis de crecimiento de los controles negativos.

Los controles negativos permiten detectar aquellas proteínas que dan interacciones inespecíficas, incrementando el número de falsos positivos. La activación de los genes reporteros, y la consiguiente capacidad de crecimiento en medio selectivo de las cepas diploides que expresan simultáneamente una determinada proteína fusionada al extremo Cub y el dominio soluble Nub ponen de manifiesto que esa proteína es capaz de promover la interacción de los dominios Cub y Nub sin necesidad de interactuar con otra proteína.

El análisis cuantitativo del comportamiento de las proteínas de la colección de cepas Cub en los controles negativos reveló que aproximadamente un 70% de estas cepas superan el control negativo y muestran una DO_{595} inferior a 0,15 (ausencia de crecimiento) cuando el ensayo se realiza en un medio carente de metionina (Figura 11). Además, mientras que en estas condiciones un 7% restante presenta crecimiento muy pobre ($0,15 > DO_{595} > 0,25$), un 23% muestra un claro crecimiento ($DO_{595} > 0,25$). La realización del ensayo en medio suplementado con 250 μ M de metionina, que disminuye la expresión de las proteínas Y-Cub, disminuye unas tres veces (8,1%) el número de cepas que muestran crecimiento en el control negativo y, por tanto, aumenta notablemente la especificidad del ensayo.

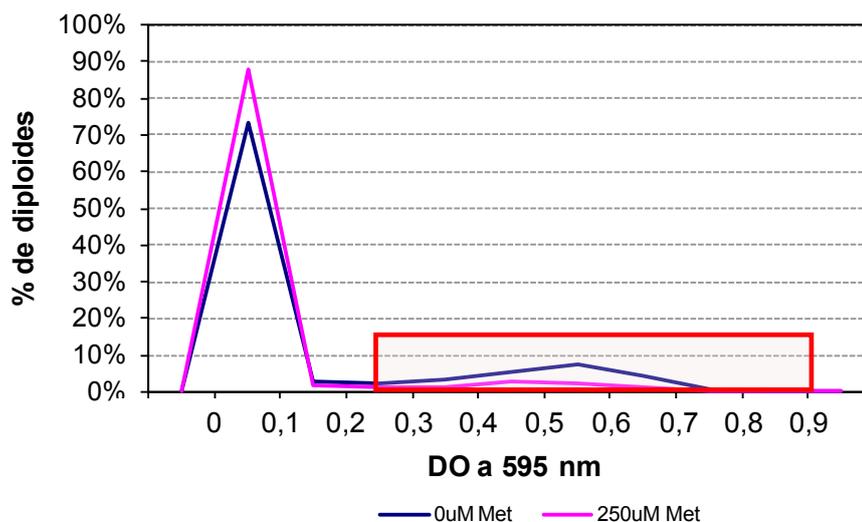


Figura 11. Distribución de las DO_{595} de los diploides utilizados como control negativo. La línea de color rosa representa el crecimiento en medio selectivo suplementado con $250 \mu\text{M}$ de metionina. La línea de color azul representa el crecimiento en medio selectivo sin metionina. El recuadro rojo es el porcentaje de cepas que presentan un crecimiento con una DO_{595} superior de 0,25.

Las cepas Cub que no pasan el control negativo también muestran interacción con la mayoría de las cepas Nub. El comportamiento anómalo de estos clones puede ser debido a que la secuencia señal de la proteína heteróloga no es reconocida en levadura, provocando su retención y acumulación, a niveles no fisiológicos, en el Golgi o retículo endoplásmico donde se facilitan eventualmente las interacciones transitorias inespecíficas dando un mayor número de falsos positivos (Dünnwald *et al.*, 1999). También se ha observado que algunas de estas proteínas Y-Cub son capaces de autoprocresarse en ausencia del extremo amino Nub, liberándose el factor PLV y provocándose la activación de los genes reporteros.

Las 19 cepas Cub que no pasan el control negativo fueron eliminadas en los ensayos posteriores. Estas proteínas, en su conjunto, no muestran ninguna característica estructural o funcional que explique su comportamiento. Entre ellas destaca el grupo que expresa proteínas de la familia de las acuoparinas (Tabla 2).

Proteína	Nºaccesión	Breve descripción
AtNIP1.1	<i>At4g19030</i>	acuoporina
AtNIP1.2	<i>At4g18910</i>	acuoporina
AtNIP5.1	<i>At4g10380</i>	acuoporina
AtCNGC13	<i>At4g01010</i>	putativo canal iónico regulado por nucleotidos cíclicos y calmodulina
AtCAT7	<i>At3g10600</i>	putativo transportador de aminoácidos catiónicos
AtTIP4.1	<i>At2g25810</i>	acuoporina
AtTIP3.2	<i>At1g17810</i>	acuoporina
AtSTP2	<i>At1g07340</i>	monosacárido-protón simporter específico de gametocito

(Continuación Tabla 2)

Proteína	Nºaccesión	Breve descripción
AtPUP3	At1g28220	putativa purina permeasa
AtPUP4	At1g30840	putativa purina permeasa
AtLAT4	At1g31830	proteína relacionada con el control de la muerte celular
AtMLO12	At2g39200	proteína transportadora de aminoácidos neutros
AtNIP4.1	At5g37810	acuoporina
AtPIP1.4	At4g00430	acuoporina
AtSIP1.2	At5g18290	acuoporina
AtNHX1	At5g27150	transportador antiporter sodio/protón
AtYSL3	At5g53550	transportador de oligopéptidos
AtKCO5	At4g01840	canales de iones potasio
AtPTR1	At3g54140	transportador de oligopéptidos dependientes de protones

Tabla 2. Cepas Cub que no superan el control negativo.

III.4.1.b. Análisis de los controles positivos.

Como se ha mencionado anteriormente, el control positivo corresponde a la cepa que expresa el extremo amino de la ubiquitina silvestre Nub. Este dominio posee una alta afinidad por el extremo Cub y la reconstrucción de la ubiquitina es espontánea y no depende de la interacción previa de otras proteínas a las que estos dominios deban estar fusionados. De esta forma, en todos los diploides formados entre las cepas de la colección Y-Cub y el control positivo Nub se debería producir la reconstrucción de la ubiquitina, la liberación del factor PLV y la consiguiente activación de los genes reporteros que proporcionan a los diploides la capacidad de crecimiento en medio selectivo.

La fiabilidad de la colección de cepas Y-Cub respecto al control positivo se realizó analizando cuantitativamente su capacidad de crecimiento de forma análoga a la realizada con el control negativo. Dicho análisis muestra que únicamente el 60% de los clones Y-Cub pasan el control positivo ($DO_{595} > 0,25$) tras cinco días de incubación en medio suplementado con 250 μ M de metionina (Figura 12). La fracción de clones capaces de pasar el control aumenta notablemente (80%) cuando se relajan las condiciones del ensayo, es decir, en ausencia de metionina que no reprime la expresión de la proteínas Y-Cub (Figura 12).

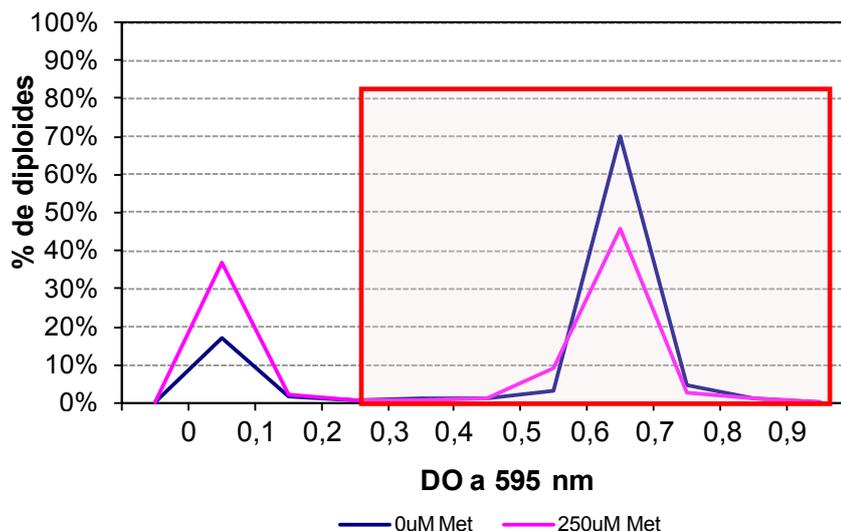


Figura 12. Distribución de las DO_{595} de los diploides formados con las cepas Y-Cub y la cepa utilizada como control positivo a los 5 días. En azul se muestra el porcentaje de diploides que crecen en un medio sin metionina. En rosa representa en porcentaje de diploides que crecen en un medio suplementado con 250 μ M de metionina. El recuadro rojo representa el porcentaje de diploides que superan el control positivo.

Incluso en estas últimas condiciones, cinco cepas (3%) fueron incapaces de mostrar crecimiento ($DO_{595} < 0,25$) después de 7 días de incubación y, en consecuencia, fueron descartadas en los sucesivos ensayos de interacción. Estas cepas expresan proteínas que, en general, difieren en su localización, función, tamaño y dominios transmembrana (Tabla 3).

Proteína	Nºaccesión	Breve descripción
AtBRX	At1g31880	factor de transcripción del tipo BRX
AtRLP10	At1g65380	receptor de la superficie celular
AtSTP12	At4g21480	transportador simporter de monosacáridos dependiente de protones
AtKCO4	At1g02510	canal de potasio
AtCNGC2	At5g15410	canal de potasio y de cationes monovalentes activado por AMPc

Tabla 3. Cepas Cub que no superan el control positivo.

Una posible explicación al comportamiento de estas cepas es que las proteínas Y-Cub que expresan no muestran una localización citosólica de su extremo carboxílico y, por tanto, se evite su interacción con el dominio Nub que expresa el control positivo. Sin embargo, sí se ha podido comprobar que estas mismas proteínas son capaces de interactuar con alguno de los restantes clones Y-Cub cuando están fusionadas al dominio Nub, lo que contradice la explicación anterior. En cualquier caso, no se puede descartar que la fusión de estas proteínas al dominio Cub-PLV, que posee un tamaño considerable (5-47 kDa), altere su conformación y

la correcta localización citosólica de su extremo Cub, mientras que no sucede lo mismo en el caso de su fusión al dominio Nub, que es de menor tamaño (5 kDa).

Un aspecto relevante del análisis de los controles positivos y negativos es la influencia de la estringencia del ensayo (niveles de expresión de la proteína Y-Cub controlados por la represión por metionina del promotor *Met25*) sobre los resultados del mismo. De esta forma, es evidente que existe un compromiso entre la estringencia usada en el ensayo y la especificidad de la interacción. Al aumentar la estringencia disminuye el número de interacciones detectadas aumentando la especificidad de la interacción y viceversa.

El uso de un promotor reprimible como el usado en este trabajo aporta una solución al compromiso estringencia/especificidad permitiendo realizar los ensayos a distintos grados de estringencia. De este modo, se pueden detectar tanto interacciones fuertes como débiles o las producidas entre proteínas cuya expresión es baja o elevada, ampliándose el rango de proteínas aptas para el ensayo SU.

III.4.2. Tratamiento estadístico de los datos derivados del ensayo de la SU.

Los análisis a gran escala de interacciones proteicas proporcionan un número muy elevado de datos que suelen depender de distintas variables y requieren un tratamiento estadístico de estandarización que permita equiparar cualquier dato dentro del conjunto de datos obtenidos. En este trabajo la estandarización de los datos debe permitir comparar y filtrar el crecimiento de los distintos diploides en todas las condiciones estudiadas (distintos medios, distintos tiempos de incubación, características propias de cada proteína Cub o Nub, efectos de crecimiento inespecífico de algunos clones o placas, cantidad de células inoculada, etc.) seleccionándose solamente los datos estadísticamente significativos (hot spot) dentro de la distribución.

El proceso de estandarización más habitual en el análisis de los datos de las estrategias “ómicas” consiste en el cálculo del valor Z-score. En este trabajo la obtención del Z-score vino determinada por parámetros robustos de la tendencia central como son la mediana y el espacio intercuartílico que hacen que la distribución de valores se vea menos afectada por valores extremos, que representan el crecimiento de los diploides.

Utilizando estos parámetros se procedió al proceso de estandarización realizando tres niveles de agrupamiento: el primero de ellos, a nivel de placa, que compara los resultados dentro de una misma placa; el segundo, a nivel de cepa Cub, que permite el contraste de todos

los valores que se obtienen de una misma cepa Cub con los correspondiente Nub y por último todos los resultados obtenidos con cada cepa Nub. Este tratamiento de datos hace que los valores más altos de Z-score correspondan a aquellos diploides que muestran un crecimiento mayor que los de la placa a la que pertenecen, mayor que el resto de los diploides en los que están implicados esos clones Cub y mayor que el crecimiento de los diploides en los que están implicados los correspondientes clones Nub.

Tras el proceso de estandarización, para determinar qué interacciones fueron consideradas positivas se utilizaron dos criterios:

- Crecimiento positivo, considerándose como tal una $DO_{595} > 0,25$.
- Valor Z-score superior a 5,5. Este valor viene determinado por el uso de un valor de significación de 0,01 y la aplicación de la corrección de Bonferroni que relaciona el valor significativo con el número de datos totales.

La aplicación de estos dos criterios permite delimitar la zona de selección de los resultados positivos como se representa en la gráfica de la Figura 13.

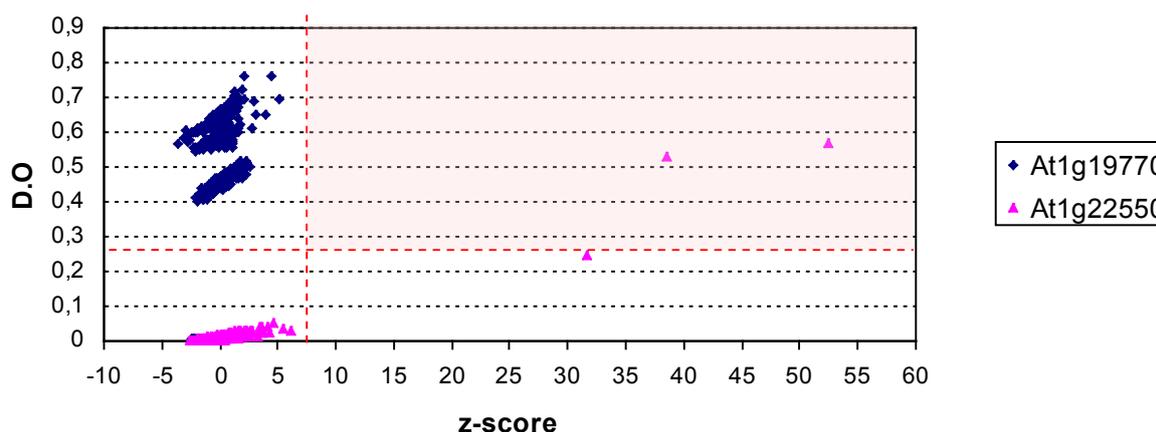


Figura 13. Distribución de los valores obtenidos para las proteínas At1g19770-Cub y At1g22550-Cub tras medir la densidad óptica a 595nm y tras el proceso de estandarización. La zona de color rosa delimita los resultados positivos cuyo Z-score supera un valor de 5,5 y cuya DO_{595} es superior a 0,25.

III.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO SU.

Teniendo en cuenta los dos criterios anteriormente descritos, al analizar el conjunto de datos resultantes se estimó que, tras la eliminación de los resultados correspondientes a la proteína AtPGP19 (*At3g28860*) que no son fiables al no conservar su estructura en la levadura por estar hiperglicosilada (Blakeslee *et al.*, 2007), el crecimiento de 1453 diploides lleva asociado interacciones positivas, lo que equivale aproximadamente a un 2% de las interacciones analizadas.

III.5.1. Interacciones recíprocas

La existencia de interacción recíproca entre dos proteínas, es decir, aquella que se da entre los miembros de una pareja de proteínas que muestran interacción positiva independientemente de que estén fusionados al dominio Nub o al Cub, dota de un alto grado de verosimilitud a dicha interacción (Miller *et al.*, 2005).

El análisis de los datos del ensayo realizado en este trabajo revela la existencia de 21 interacciones recíprocas lo que representa aproximadamente un 7% del total; de estas, 8 corresponden a interacciones homoméricas, es decir aquellas que involucran a una única proteína (Tabla 4).

(Continuación Tabla 4)

Tabla 4. Interacciones recíprocas obtenidas del ensayo SU realizado.

Entre las proteínas que muestran interacción recíproca destacan cinco parejas de proteínas que pertenecen a la familia de las acuaporinas. Tres de estas acuaporinas pertenecen a la familia PIP y el significado biológico de estas interacciones puede ser el reflejo de la naturaleza tetramérica de esta clase de proteínas al formar los canales de membrana que, en su mayoría, transportan moléculas de agua (Beuron *et al.*, 1995; Daniels *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2000; Echevarría *et al.*, 2006; Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006).

III.5.2. Análisis comparativo de los resultados obtenidos con distintas bases de datos.

La comparación de los resultados obtenidos en distintos estudios permite robustecer el significado de las interacciones, tanto positivas como negativas, así como ampliar el interactoma. Con este objetivo se compararon los resultados obtenidos en este trabajo con las interacciones descritas en las siguientes bases de datos:

- AtPID (Cui *et al.*, 2008) es una base de datos específica para *A. thaliana* que incluye resultados de interacciones físicas que han sido publicadas y propone nuevas interacciones en base a distintas técnicas de análisis *in silico* de interacciones proteicas como son el análisis de los perfiles filogenéticos, la fusión de genes, la coevolución de la expresión génica, el análisis de genes vecinos en el contexto genómico, el acoplamiento computacional de proteína-proteína así como otros que contrastan la función biológica, la localización celular o los perfiles de expresión.

- *Arabidopsis* Interactions Viewer (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/Arabidopsis_interactions_viewer.cgi; Geisler-Lee *et al.*, 2007); y la base de datos descrita por De Bodt *et al.*, 2009 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/supplementary_data/stbod/athPPI/site.php). Ambas están especializadas en las predicciones de

interacciones proteicas de las proteínas de *A. thaliana* basadas en métodos bioinformáticos similares a los mencionados anteriormente.

- BioGRID (<http://www.thebiogrid.org>; Stark *et al.*, 2006), e IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact>; Kerrien *et al.*, 2007) son bases de datos que recopilan las interacciones proteicas físicas que han sido descritas en la literatura y que no están limitadas a *A. thaliana*.

- La base de datos STRING 8 (<http://string.embl.de>; von Mering *et al.*, 2005, 2007; Jensen *et al.*, 2009) recopila las interacciones publicadas y predice nuevas interacciones proteicas utilizando distintos métodos de análisis computacionales.

Dado que las distintas bases de datos difieren tanto en la selección de artículos como en el número de proteínas analizadas y las aproximaciones bioestadísticas y bioinformáticas utilizadas, sus resultados son dispares. Así, mientras que los datos procedentes de bases de datos que contemplan interacciones físicas obtenidas por métodos experimentales presentan un elevado grado de solapamiento, las bases de datos que se basan en métodos predictivos muestran resultados poco redundantes tanto entre los de este tipo de bases como con los datos derivados de aproximaciones empíricas (De Bodt *et al.*, 2009).

Cuando se comparan los resultados de este trabajo con los resultados depositados en bases de datos derivados de aproximaciones experimentales (AtPID; BioGRID, STRING 8 e IntAct) se observa que 6 de un total de 39 interacciones físicas descritas en la literatura, y que involucran a proteínas de este trabajo, son corroboradas por el ensayo realizado (Tabla 5).

Tabla 5. Interacciones proteicas físicas corroboradas en el ensayo realizado.

Estos resultados no solo confirman la interacción de esas 6 parejas de proteínas sino que, además, demuestran que las interacciones se producen cuando las proteínas son completas, están localizadas en su posición nativa en la membrana y mantienen una estructura terciaria o cuaternaria similar a la que puedan tener en la planta.

Además, los resultados de este trabajo muestran que las interacciones efectivamente tienen lugar *in vivo*; completando la información sobre interacciones que únicamente estaban basadas en ensayos *in vitro* con proteínas solubilizadas como sucede en algunas de las interacciones encontradas.

Por su relevancia biológica, algunas de las interacciones identificadas en este trabajo y que corroboran resultados parciales previos fueron analizadas individualmente para su confirmación. Por ejemplo, se pudo verificar la formación de complejos proteicos entre las proteínas transportadoras de tipo Shaker y que estas interacciones pueden constituir la base estructural para la formación de complejos hetero u homotetrámeros como había sido propuesto por otros autores (Urbach *et al.*, 2000).

Las distintas estructuras multiproteicas formadas por transportadores de tipo Shaker difieren en las proteínas que las componen dependiendo de las necesidades celulares y el tipo de célula, lo que proporciona un aumento y especialización en el número de complejos transportadores de potasio en planta. Este comportamiento pudo comprobarse entre los transportadores AtKAT1-AtKAT1 y AtKAT1-AtAKT1 cuya interacción puede relacionarse con la captación de potasio en raíces o células estomáticas (Dreyer *et al.*, 1997; Urbach *et al.*, 2000; Obrdlik *et al.*, 2004) y cuyos resultados se muestran en la Figura 14.

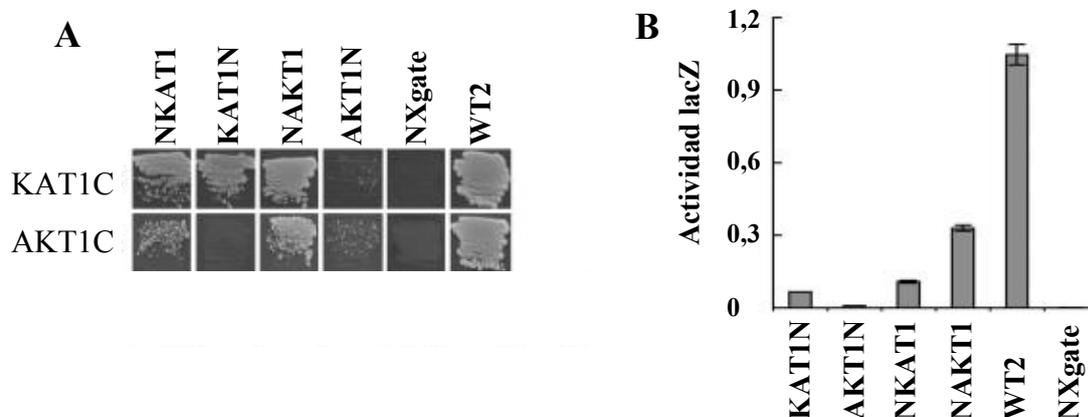


Figura 14. Ensayo SU individualizado de las parejas proteicas AtKAT1-AtKAT1 y AtKAT1-AtAKT1. A). Crecimiento en medio sin histidina y adenina. B). Análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa. WT2 representa el control positivo. NXgate representa el control negativo.

Como se ha mencionado anteriormente, el porcentaje de interacciones identificadas en otros trabajos experimentales y que son corroboradas por este ensayo SU es bajo (15,4%). Sin embargo, estos niveles son frecuentes en los ensayos a gran escala de interacciones de proteínas debido a que las técnicas utilizadas tienen distinta sensibilidad y pueden presentar restricciones experimentales que afectan a los resultados (Ito *et al.*, 2001). En la tabla 6 se muestran las 33 interacciones previamente identificadas y que no son corroboradas en este trabajo.

PROTEÍNA	PROTEÍNA	MÉTODOS UTILIZADOS	AUTOR
AtSYP21 (<i>At5g16830</i>) Proteína t-SNARE	AtVTH11 (<i>At5g39510</i>) Proteína v-SNARE	Coimmunoprecipitación, microscopía electrónica. Cosedimentación por gradiente de densidad.	Zheng <i>et al.</i> , 1999, Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtSYP21 (<i>At5g16830</i>) Proteína t-SNARE	AtSYP51 (<i>At1g16240</i>) Proteína t-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtSYP21 (<i>At5g16830</i>) Proteína t-SNARE	AtSYP22 (<i>At5g46860</i>) Proteína t-SNARE	Cosedimentación por gradiente de densidad, coimmunoprecipitación, microscopía electrónica.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 1999
AtSYP41 (<i>At5g26980</i>) Proteína t-SNARE	AtSYP61 (<i>At1g28490</i>) Proteína t-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtSYP41 (<i>At5g26980</i>) Proteína t-SNARE	AtVTH12 (<i>At1g26670</i>) Proteína v-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtSYP41 (<i>At5g26980</i>) Proteína t-SNARE	AtAtYKT61 (<i>At5g58060</i>) Proteína t-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Chen <i>et al.</i> , 2005
AtSYP41 (<i>At5g26980</i>) Proteína t-SNARE	AtVTH11 (<i>At5g39510</i>) Proteína v-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Bassham <i>et al.</i> , 2000
AtSYP22 (<i>At5g46860</i>) Proteína t-SNARE	AtVTH12 (<i>At1g26670</i>) Proteína v-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Niihama <i>et al.</i> , 2005
AtSYP22 (<i>At5g46860</i>) Proteína t-SNARE	AtSYP51 (<i>At1g16240</i>) Proteína t-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtSYP22 (<i>At5g46860</i>) Proteína t-SNARE	AtVTH11 (<i>At5g39510</i>) Proteína v-SNARE	Coimmunoprecipitación. Coimmunoprecipitación. Cosedimentación por gradiente de densidad, coimmunoprecipitación, microscopía electrónica.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001 Yano <i>et al.</i> , 2003 Zheng <i>et al.</i> , 1999
AtVTH11 (<i>At5g39510</i>) Proteína v-SNARE	AtSYP51 (<i>At1g16240</i>) Proteína t-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtVTH12 (<i>At1g26670</i>) Proteína v-SNARE	AtSYP61 (<i>At1g28490</i>) Proteína t-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtVTH12 (<i>At1g26670</i>) Proteína v-SNARE	AtSYP51 (<i>At1g16240</i>) Proteína t-SNARE	Coimmunoprecipitación.	Sanderfoot <i>et al.</i> , 2001
AtERS1 (<i>At2g40940</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	AtERS1 (<i>At2g40940</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	MeRA, SUS.	Grefen <i>et al.</i> , 2008
AtERS1 (<i>At2g40940</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	AtERS2 (<i>At1g04310</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	MeRA, SUS.	Grefen <i>et al.</i> , 2008
AtERS1 (<i>At2g40940</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	AtEIN4 (<i>At3g04580</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	MeRA, SUS.	Grefen <i>et al.</i> , 2008
AtERS2 (<i>At1g04310</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	AtEIN4 (<i>At3g04580</i>) Putativo receptor de etileno e histidina proteína quinasa	MeRA, SUS.	Grefen <i>et al.</i> , 2008
AtMDR/AtPGP1 (<i>At2g36910</i>) Transportador tipo ABC subfamilia B	AtPIN1 (<i>At1g73590</i>) Exportador de auxina	Microscopía confocal y coimmunoprecipitación.	Blakeslee <i>et al.</i> , 2007
AtPIN2 (<i>At5g57090</i>) Exportador de auxina	AtMDR/AtPGP1 (<i>At2g36910</i>) Transportador tipo ABC subfamilia B	Microscopía confocal.	Blakeslee <i>et al.</i> , 2007
AtSUC2 (<i>At1g22710</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	AtSUT2 (<i>At2g02860</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	SUS.	Schulze <i>et al.</i> , 2003
AtSUC2 (<i>At1g22710</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	AtSUT4 (<i>At1g09960</i>) Transportador de baja afinidad simpporter H ⁺ /Glucosa	SUS.	Schulze <i>et al.</i> , 2003
AtSUC2 (<i>At1g22710</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	AtSUC2 (<i>At1g22710</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	SUS.	Schulze <i>et al.</i> , 2003
AtSUT2 (<i>At2g02860</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	AtSUT4 (<i>At1g09960</i>) Transportador de baja afinidad simpporter H ⁺ /Glucosa	SUS.	Schulze <i>et al.</i> , 2003
AtSUT2 (<i>At2g02860</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	AtSUT2 (<i>At2g02860</i>) Transportador simpporter H ⁺ /Glucosa	SUS.	Schulze <i>et al.</i> , 2003

(Continuación Tabla 6)

PROTEÍNA	PROTEÍNA	MÉTODOS UTILIZADOS	AUTOR
AtKCOI (<i>At5g55630</i>) Subunidad del poro-tandem del canal de cationes potasio	AtGRF1 (<i>At4g09000</i>) Proteína reguladora de señal tipo 14-3-3	Pulldown y colocalización.	Latz <i>et al.</i> , 2007
AtKCOI (<i>At5g55630</i>) Subunidad del poro-tandem del canal de cationes potasio	AtKCOI (<i>At5g55630</i>) Subunidad del poro-tandem del canal de cationes potasio	BIFC, FRET.	Voelker <i>et al.</i> , 2006
AtRPKI (<i>At1g69270</i>) Receptor putativo proteína quinasa	AtCaM1 (<i>At5g37780</i>) Calmodulina	Array de proteínas.	Popescu <i>et al.</i> , 2007
AtMDR/AtPGPI (<i>At2g36910</i>) Transportador tipo ABC subfamilia B	AtCaM1 (<i>At5g37780</i>) Calmodulina	Array de proteínas	Popescu <i>et al.</i> , 2007
AtMDR/AtPGPI (<i>At2g36910</i>) Transportador tipo ABC subfamilia B	AtTWD1 (<i>At3g21640</i>) Peptidil-prolyl isomerasa unida a membrana	Dos híbridos, reconstrucción del complejo, cofraccionamiento y copurificación.	Geisler <i>et al.</i> , 2003
AtCNGC1 (<i>At5g53130</i>) Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclico	AtCaM5 (<i>At2g27030</i>) Calmodulina	Dos híbridos, FRET.	Köhler <i>et al.</i> , 2000, Ali <i>et al.</i> , 2005
AtCNGC1 (<i>At5g53130</i>) Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclico	AtCaM4 (<i>At1g66410</i>) Calmodulina	Dos híbridos.	Köhler <i>et al.</i> , 1999, Köhler <i>et al.</i> , 2000
AtTWD1 (<i>At3g21640</i>) Peptidil-prolyl isomerasa unida a membrana	AtMRP1 (<i>At1g30400</i>) Putativo transportador fitoquelatna-metal/metaloide	Dos híbridos, reconstrucción del complejo, cofraccionamiento, western de captura de afinidad.	Geisler <i>et al.</i> , 2004
AtCPKI/AtAKI (<i>At5g04870</i>) Putativa proteína quinasa dependiente de calcio	AtGRF2 (<i>At1g78300</i>) Proteína reguladora de señal tipo 14-3-3	Far Western, ensayos enzimáticos TAP.	Camoni <i>et al.</i> , 1998, Chang <i>et al.</i> , 2009.

Tabla 6. Interacciones proteicas identificadas experimentalmente y que no solapan con los resultados obtenidos. En marrón las interacciones entre las proteínas SNARE.

Por ejemplo, la mayoría de las interacciones físicas que no son confirmadas en este trabajo tienen lugar entre las proteínas de la familia SNARE, cuya función biológica está relacionada con los procesos de fusión de vesículas (Tabla 6, en marrón).

El análisis informático de la estructura de esta clase de proteínas, así como resultados previos (Hughson., 1999; Pratelli *et al.*, 2004), indican que su extremo C-terminal no presenta localización citoplasmática sino que previsiblemente está localizado en el interior de vesículas u otros orgánulos o, incluso, se encuentre inmerso en la membrana. Este hecho explicaría por qué las interacciones entre las proteínas SNARE no son detectadas en nuestro ensayo SU ya que este requiere que tanto el dominio Nub de una proteína como el Cub de su pareja estén localizados en el citosol.

Los clones Cub-PLV de las proteínas SNARE son capaces de pasar el control positivo, es decir, que interaccionan con el dominio Nub soluble. Por tanto, a pesar de tener un extremo C-terminal embebido en la membrana, la fusión al dominio Cub-PLV debe permitir que este último esté accesible en el espacio citoplasmático. En consecuencia, la falta de interacción en el ensayo realizado entre las proteínas SNARE podría ser debido a que su dominio Nub C-terminal no presente localización citoplasmática. El diferente comportamiento en cuanto a la accesibilidad de los dominios Nub y Cub que están fusionados a la misma proteína podría ser debido tanto por la diferencia en el tamaño de ambos tipos de dominios, mucho mayor el Cub que el Nub, como a sus propias estructuras que, en última instancia, podrían determinar

diferentes conformaciones y plegamientos. Para explorar esta hipótesis se analizaron las interacciones entre tres proteínas SNARE representativas de la familia (AtSYP21 (*At5g16830*), AtVTI11 (*At5g39510*) y AtSYP22 (*At5g46860*) entre las que han sido descritas interacciones físicas a través de diferentes técnicas experimentales como coimmunoprecipitación, microscopía electrónica o cosedimentación en gradiente de densidad (Zheng *et al.*, 1999; Sanderfoot *et al.*, 1999; 2001; Yano *et al.*, 2003). Estas tres proteínas tienen perfiles hidrofóbicos similares entre sí y con las restantes proteínas SNARE y predicen un dominio C-terminal transmembrana (Figura 15).

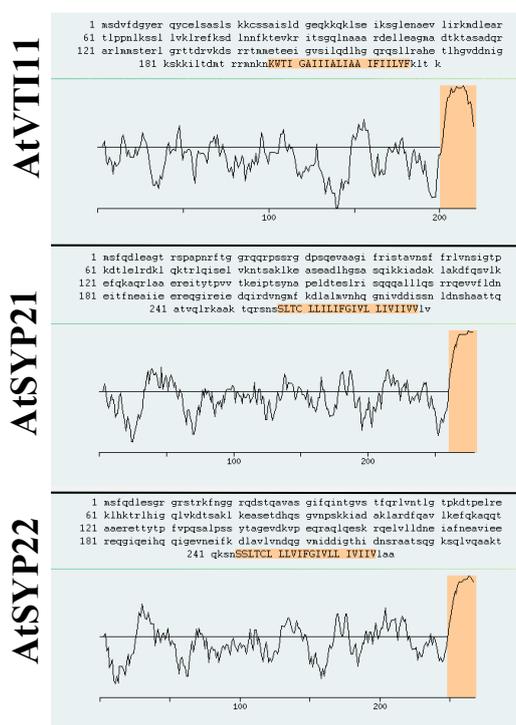


Figura 15. Perfiles hidrofóbicos de las proteínas SNARE AtSYP21 (*At5g16830*), AtVTI11 (*At5g39510*), AtSYP22 (*At5g46860*). La zona hidrofóbica en naranja.

Con el fin de comprobar si la incapacidad de detectar en el ensayo SU la interacción entre estas proteínas SNARE era debida a que el dominio Nub no está accesible en el citoplasma, los ORFs *AtSYP21*, *AtVTI11*, *AtSYP22* fueron clonados en el vector pNXgate33-3Ha que determina la fusión del dominio Nub en el extremo N-terminal de la proteína en lugar de en el extremo C-terminal.

Los ensayos de interacción SU realizados con estos nuevos clones revelan que existe interacción positiva entre la proteína AtVTI11-Cub y las proteínas AtSYP22 y AtSYP21 cuando estas últimas poseen el dominio Nub en el extremo amino (NSYP22 y NSYP21). En cambio no ocurre lo mismo cuando el dominio Nub está fusionado en el extremo carboxilo (SYP22N y SYP21N) (Figura 16). También se obtienen los mismos resultados con AtSYP21-Cub y las proteínas AtSYP22 y AtVTI11.

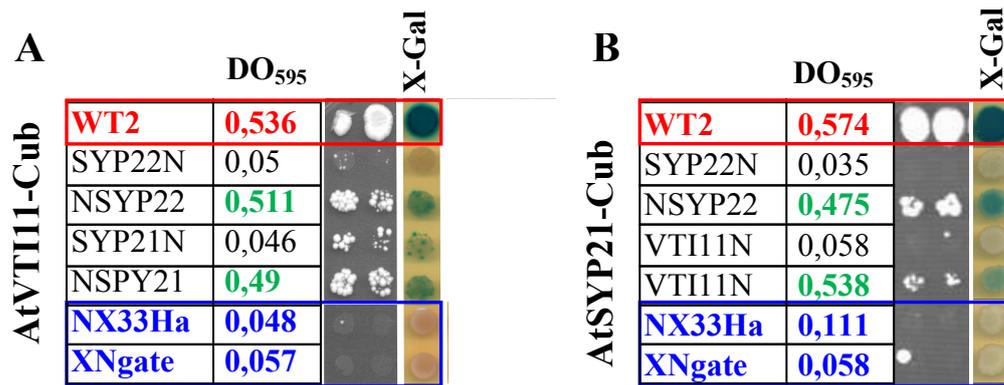


Figura 16. Ensayos de SU con tres proteínas de la familia SNARE, AtVTI11, AtSYP21, AtSYP22. Se analiza la DO₅₉₅, el crecimiento en medio sólido y la actividad β-galactosidasa. Controles negativos, diploides que llevan los plásmidos Nub vacíos. Control positivo, diploide que lleva el plásmido WT2. A). Resultados obtenidos con la proteína AtVTI11-Cub como cebo. B). Resultados obtenidos con la proteína AtSYP21-Cub como cebo.

Estos resultados sugieren que en las proteínas de fusión SNARE el dominio Nub presenta una localización citosólica cuando se encuentra unido al extremo N-terminal pero no cuando está fusionado al extremo C-terminal. Generalizando estos resultados, se podría explicar por qué las interacciones entre las proteínas SNARE, que están bien documentadas en la literatura, no pudieron ser detectadas en el ensayo SU a gran escala realizado en este trabajo. Estos resultados también demuestran que el ensayo SU puede ser modificado de forma que la fusión del dominio Nub en el extremo N-terminal de las proteínas a ensayar elimina eficazmente algunas de sus restricciones experimentales.

Además de las proteínas SNARE, las interacciones AtERS1-AtERS1, AtERS1-AtERS2, AtERS1-AtEIN4, AtERS2-AtEIN4 tampoco han podido ser detectadas en este trabajo a pesar de haber sido identificadas experimentalmente. En este caso, la conformación que adquieren estas proteínas completas al unirse al dominio Nub no permite la correcta liberación del factor PLV, observándose tan solo resultados positivos con las proteínas truncadas (Grefen *et al.*, 2008).

Tampoco ha sido posible detectar interacciones en el caso de las parejas proteicas AtPIN2-AtPGP1 y AtPIN1-AtPGP1. La interacción de estas proteínas parece requerir la expresión de otro tipo de proteínas, como AtTWD1 o AtFAGP2, o de moléculas (lípidos, partículas del citoesqueleto, pared celular, etc.) que permiten que estas interacciones puedan ser identificadas en *A. thaliana* pero no en *S. cerevisiae* donde los resultados han sido negativos utilizando diversas estrategias (Geisler *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2004; Michniewicz *et al.*, 2007; Blakeslee *et al.*, 2007).

Entre las causas de la falta de solapamiento con el resto de las interacciones físicas (Tabla 6) están tanto la distinta sensibilidad de las técnicas utilizadas como el hecho de que, en muchos casos, las interacciones descritas en otros trabajos se han realizado con fragmentos proteicos solubles que no mantienen la conformación de la proteína nativa. Este tipo de fragmentos son propensos a mostrar interacciones inespecíficas con proteínas de la misma familia o con aquellas que contienen dominios similares. Un ejemplo lo representaría la interacción detectada entre las proteínas AtKCO1 y AtGRF1 de la cual se especula que pueda ser un artefacto del método empleado (Latz *et al.*, 2007).

Además de la comparación con bases de datos fundamentadas en aproximaciones experimentales, también se analizó el solapamiento de los resultados obtenidos con los de bases de datos que predicen posibles interacciones y que se fundamentan en métodos computacionales o bioinformáticos.

(Continuación Tabla 7)

Tabla 7. Interacciones predichas que se confirman en este trabajo. AIV es la abreviatura de la base de datos Arabidopsis Interaction Viewer. En amarillo interacciones que han sido demostradas empíricamente. En rosa interacciones entre proteínas de la familia de las acuaporinas.

La comparación con las bases de datos AtPID, AIV y la construida por De Bodt permitió identificar 22 interacciones coincidentes (Tabla 7). Entre estas, cabe destacar algunas interacciones recíprocas y un grupo numeroso de proteínas pertenecientes a la familia de las acuaporinas.

III.5.3. Análisis individualizado de las interacciones entre las proteínas acuaporinas.

Varios trabajos experimentales han demostrado que en diferentes organismos como *E. coli*, insectos, judías, lentejas, espinacas y el hombre las acuaporinas interaccionan entre sí dando lugar a tetrámeros, hetero u homotetrámeros, cuyos monómeros se asocian mediante interacciones hidrofóbicas (Beuron *et al.*, 1995; Harvengt *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2000; Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006).

En el ensayo SU realizado en este trabajo están incluidas un total de 24 acuaporinas que pueden ser agrupadas, atendiendo a su localización y a su similitud de secuencia de aminoácidos, en 4 subfamilias (Maurel *et al.*, 2008; Benga., 2009):

- La subfamilia PIPs (Plasma membrana Intrinsic Protein) cuyas proteínas están localizadas preferentemente en la membrana plasmática donde contribuyen mayoritariamente al transporte extracelular e intracelular de agua en plantas (Schüssler *et al.*, 2008; Benga., 2009).
- La subfamilia TIPs (Tonoplast Intrinsic Protein) cuya localización mayoritaria es la membrana vacuolar. Estas proteínas se encargan del transporte de agua y pequeñas moléculas a través del tonoplasto, participando tanto en procesos de osmorregulación como en importantes rutas metabólicas como el ciclo de la urea o la síntesis de aminoácidos (Benga., 2009).
- La subfamilia NIPs (Nodulin Intrinsic Protein) con miembros localizados en la membrana plasmática y en las membranas intracelulares. Su nombre es debido a su gran homología con la acuaporina GmNod 26 presente en la membrana peribacteriana de los nódulos simbióticos de fijación de nitrógeno en raíces de soja.
- La subfamilia SIPs (Small basic Intrinsic Protein) que agrupa proteínas localizadas en su mayoría en el RE, donde se especula que ejercen funciones específicas como el mantenimiento de su forma vesicular (Benga., 2009).

En el ensayo SU realizado se ha detectado un número considerable de interacciones entre los miembros de esta familia de proteínas que, por su elevado grado de reciprocidad y coincidir con las predicciones bioinformáticas, sugieren la existencia de un complejo modelo de interacciones en la formación del complejo funcional. Con el fin de analizar detalladamente estas interacciones altamente probables se realizaron una serie de análisis individualizados que se describen a continuación.

III.5.3.a. Resultados de las interacciones entre las proteínas PIPs.

El ensayo SU a gran escala incluye 7 proteínas de la subfamilia PIP de *A. thaliana* aunque tan solo 6 participan en interacciones recíprocas o están involucradas en interacciones descritas en las bases de datos.

Con estas 6 proteínas (AtPIP1.1, AtPIP1.2, AtPIP2.1, AtPIP2.2, AtPIP2.3, AtPIP2.6) se llevó a cabo un ensayo más detallado en el que se utilizaron clones individuales de levaduras que expresan genes cuyas secuencias han sido verificadas por secuenciación, a diferencia del ensayo SU a gran escala en el que utilizaron “pools” de clones.

Como se muestra en la Figura 17, estos clones expresan correctamente las correspondientes proteínas PIP aunque la expresión de AtPIP2.6, y en menor medida la de

AtPIP1.1, está reducida tanto en los clones Nub como Cub. El análisis Western blot de los extractos proteicos de los clones Nub utilizando el anticuerpo primario anti-HA revela la presencia de las diferentes proteínas PIP etiquetadas con el epítipo HA cuyos tamaños corresponden a los esperados (30-31 kDa) mas el dominio Nub (5 kDa). De igual forma, el Western blot de los extractos proteicos de los clones Cub con el anticuerpo anti-VP16 permite detectar la expresión de proteínas de unos 82 kDa correspondientes a las proteínas PIP (30-31 kDa) fusionadas al dominio Cub-PLV (5-47 kDa) (Figura 17).

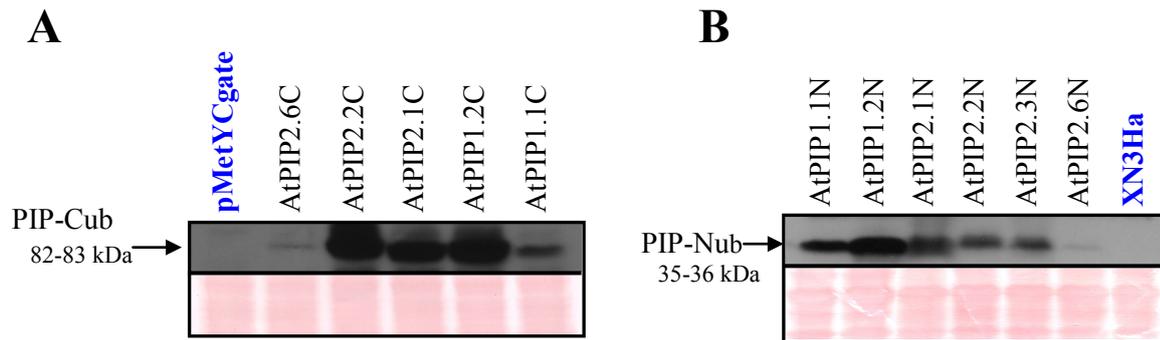


Figura 17. Western blot de las proteínas PIP-Cubs y PIP-Nubs. A). Proteínas PIP-Cub. El control negativo es la cepa con el vector vacío **pMetYCgate**. B). Proteínas AtPIP-Nub. El control negativo es la cepa con el vector vacío **pXN3Ha**.

Tras comprobar la correcta expresión de las proteínas se realizó el ensayo SU con los 30 diploides correspondientes a todas las combinaciones posibles de forma que se analizó tanto la expresión de los genes reporteros *ADE2* e *HIS3*, basándose en la capacidad de crecimiento en medio selectivo, como la expresión de los genes reporteros *lacZ* y *ADE2*, a través de la coloración de las colonias crecidas en los medios sólidos adecuados (Figura 18).

A

(Continuación Figura 18)

Como se ha demostrado anteriormente, la posición del dominio Nub en el extremo carboxilo o en el amino de la proteína a ensayar puede determinar la detección de una determinada interacción. Por ello se construyeron clones que expresan las diferentes proteínas PIP con dominios Nub fusionados al extremo amino en lugar de al extremo carboxilo.

El análisis de la expresión de las proteínas Nub-PIP mostró la presencia de las especies proteicas esperadas y en niveles abundantes con excepción de las AtPIP2.6 y AtPIP1.1 (Figura 20).

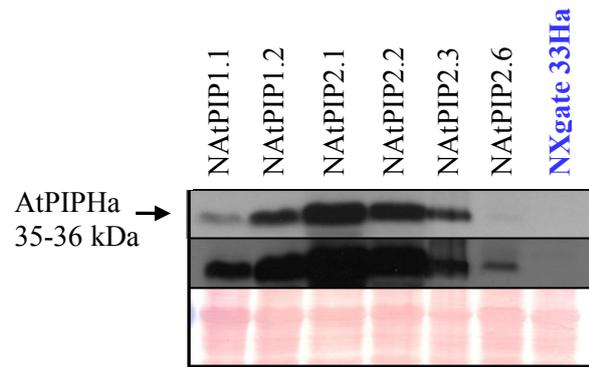


Figura 20. Análisis Western blot de las proteínas Nub-PIP. La cepa **NXgate33Ha** fue utilizada como control negativo.

Con estas nuevas construcciones se realizó el ensayo de la SU que amplía el número de interacciones que suceden entre las proteínas AtPIP.

(Continuación Figura 21)

Por último, un análisis comparativo con las distintas bases de datos dota de mayor verosimilitud a 14 de las interacciones que se han encontrado entre las proteínas PIP (Tabla 8).

III.5.3.b. Análisis de las interacciones proteicas de las proteínas TIP por el método SU.

De forma similar a lo realizado con las proteínas PIP, también se procedió al análisis detallado de las 7 acuaporinas de la subfamilia TIP.

Los resultados de este análisis muestran que las interacciones entre los miembros de esta subfamilia son más escasas, aunque merece la pena destacar 5 de las interacciones corroborando algunas de ellas los resultados obtenidos a gran escala.

III.5.3.c. Resultados del sistema SU entre las proteínas NIPs.

Por último, y siguiendo una metodología semejante a la utilizada con los miembros de las otras subfamilias de acuaporinas PIP y TIP, se analizaron de forma detallada las interacciones existentes entre las proteínas de la subfamilia NIP.

De todas las combinaciones posibles entre las 7 proteínas NIP se resaltan 3 interacciones.

IV. Discusión

IV. DISCUSIÓN.

Ni la función ni la estructura cuaternaria de la mayoría de las proteínas dependen exclusivamente de su estructura primaria, sino que están supeditadas a su interacción con otras moléculas y, de forma particular, con otras proteínas. A través de estas interacciones las proteínas son capaces de desarrollar una enorme variedad de funciones celulares estructurales, catalíticas y de transducción de señales. En numerosas ocasiones, es precisamente a través de las interacciones específicas con otras proteínas como se lleva a cabo y regula eficazmente la función proteica (Phizicky *et al.*, 1995; Brohée *et al.*, 2006). Consecuentemente, las interacciones entre proteínas desempeñan un papel esencial en el correcto funcionamiento de las células, llegando a estimarse que aproximadamente en un 80% de los casos las proteínas necesitan formar complejos o interactuar entre sí para llevar a cabo una función determinada (Berggård *et al.*, 2007).

Debido a su gran relevancia se están generando numerosas estrategias para poder identificar las interacciones entre proteínas. Aunque el análisis de las propiedades de las proteínas puede realizarse de manera individualizada o a pequeña escala, el elevado número de proteínas desvelado por los proyectos de secuenciación de genomas exige el desarrollo de nuevas estrategias “ómicas” que permitan su análisis de forma rápida, sencilla y global. Esta misma exigencia es aplicable a la identificación y caracterización de las interacciones que tienen lugar entre las proteínas de un determinado organismo. Por este motivo se está produciendo un aumento exponencial en la descripción de nuevas e interesantes interacciones proteicas. El conocimiento de estas interacciones aporta información no solo sobre la función y localización del complejo formado, sino también de las proteínas implicadas; de forma que es actualmente esencial en el análisis proteómico al facilitar la caracterización de proteínas de función, localización o regulación desconocida.

La recopilación de los datos resultantes de diferentes estudios de interacciones proteicas da lugar a intrincadas redes proteicas, que se denominan interactomas, cuyo tamaño y complejidad aumentan constantemente y cuyo análisis supone un gran reto.

El análisis de los interactomas muestra que a pesar de la abundancia e importancia biológica de las proteínas de membrana su presencia es escasa (Schwacke *et al.*, 2003; Niegowski *et al.*, 2006). Esto se debe principalmente a la dificultad de aplicar las técnicas de análisis de interacción de proteínas a las proteínas de membrana debido a la hidrofobicidad y a su dependencia estructural con las membranas celulares.

La necesidad de avanzar en el estudio de las interacciones que se dan con las proteínas de membrana ha impulsado el desarrollo de distintas estrategias entre las que destaca por su utilidad y fiabilidad el método de la SU. Este método permite analizar *in vivo* las interacciones entre parejas de proteínas completas que conservan su localización en la membrana y, por tanto, muestran una estructura similar a la que tienen en condiciones nativas.

En este trabajo se ha desarrollado una estrategia de análisis a gran escala de interacciones proteicas que es rápida y sencilla, basada en el ensayo SU (Stagljar *et al.*, 1998).

Para llevar a cabo este objetivo, se construyeron dos cepas de levaduras de tipo de apareamiento opuesto con auxotrofias y modificaciones génicas que permitiesen el uso del método de ensayo SU a gran escala.

El uso de estas dos cepas presenta las siguientes características innovadoras respecto a trabajos anteriores:

- El análisis de las interacciones se realiza en cepas diploides formadas por el apareamiento de dos células haploides, cada una de las cuales expresa una de las proteínas en estudio. De esta forma, se obtiene un gran número de cepas haploides y diploides que pueden almacenarse y conservarse fácilmente para estudios posteriores y que difieren solamente en las proteínas quiméricas que expresan.
- Las cepas desarrolladas en este trabajo tienen un crecimiento más rápido que la cepa LV40 utilizada con anterioridad (Stagljar *et al.*, 1998); permitiendo así reducir el tiempo que se requiere para la realización del ensayo.
- La cepa utilizada como cebo contiene tres genes reporteros, *ADE2*, *HIS3* y *lacZ*, cuya expresión está controlada por el “promotor-operador *lexA*”. La incorporación del gen reportero *ADE2* permite detectar la existencia de interacción proteica de forma visual mediante la observación de la coloración que adquieren las colonias de los diploides.

Paralelamente al desarrollo de nuevas cepas, también se diseñaron y construyeron vectores específicos que permiten adaptar el método SU a las estrategias “ómicas”. Una de las características de estos vectores es la presencia de secuencias recombinogénicas que permiten la clonación sencilla de los genes a expresar mediante el proceso de recombinación homóloga *in vivo* en la levadura. Además, la expresión de las proteínas cebo (proteínas Cub) está controlada por un promotor reprimible presente en el vector responsable de su expresión (MetYCgate). De esta forma, los niveles de expresión de las proteínas cebo pueden ser modificados convenientemente según la concentración de represor (metionina) en el medio de

cultivo y establecer diferentes grados de estringencia en el ensayo para optimizar los resultados.

Con el fin de demostrar la eficacia de la estrategia SU desarrollada en este trabajo, se realizó un ensayo piloto de aplicación “ómica” con una selección de 413 proteínas de *A. thaliana* que son en su mayoría proteínas de membrana (80%) o bien están funcional o estructuralmente relacionadas con estas. Aunque el número aproximado de proteínas de membrana en esta planta modelo es superior a 6.000, el grupo de proteínas seleccionado es representativo del proteoma de membrana por contener proteínas de las diferentes familias que lo componen; y es también suficientemente numeroso como para representar un análisis prospectivo del método SU desarrollado. Mientras que todas las secuencias codificantes de las proteínas seleccionadas fueron clonadas en el vector presa, XNgate, únicamente 173 fueron clonadas en el vector cebo, MetYCgate. La selección de las secuencias clonadas en el vector cebo se basó en la elevada probabilidad de que las proteínas codificadas correspondan a proteínas integrales de membrana ya que las proteínas solubles Cub son proclives a producir un número excesivo de falsos positivos. La aplicación del método SU a todas las combinaciones posibles entre los clones cebo y presa construidos representa, por tanto, más de 70000 interacciones distintas.

Un aspecto destacable del ensayo de interacción realizado consiste en su carácter cuantitativo, que está basado en la medición de la tasa de crecimiento de los diploides que expresan las proteínas cuya interacción se desea analizar. Este carácter cuantitativo, junto con la posibilidad de regular la expresión de las proteínas cebo, permite aplicar diferentes grados de estringencia al ensayo y someter los resultados a tratamientos estadísticos que discriminen eficazmente las interacciones negativas y los falsos positivos resultantes de colisiones proteicas aleatorias de las interacciones positivas verosímiles o “*bona fide*”.

El análisis de los resultados del ensayo revela la existencia de 1453 interacciones positivas que suponen aproximadamente un 2% del número total de interacciones analizadas. La gran mayoría de estas interacciones representan nuevas aportaciones en *A. thaliana* puesto que solamente 26 habían sido descritas con anterioridad, bien basándose en ensayos experimentales (6) bien en predicciones bioinformáticas (22). La frecuencia con la que un ensayo de interacción a gran escala es capaz de corroborar las interacciones que ya han sido descritas en otros estudios puede ser interpretada como un parámetro de su calidad o fiabilidad.

El grado de solapamiento de los resultados obtenidos con aproximaciones experimentales representa un 15,4% del total de las interacciones descritas que se dan entre las proteínas estudiadas. Este porcentaje, aunque aparentemente bajo, es equiparable al grado de solapamiento que se propone para las aproximaciones experimentales a gran escala de análisis de interacciones proteicas (De Bodt *et al.*, 2009). Tras un análisis bibliográfico se puede especular que las diferencias observadas con este trabajo y otras aproximaciones experimentales se deban a la distinta sensibilidad de los métodos utilizados, la utilización o no de la proteína completa, la falta de localización citoplasmática del extremo carboxilo de estas proteínas cuando son expresadas en levadura (por ejemplo el caso presentado de las proteínas SNARE), la retención en orgánulos de las proteínas en estudio que favorecen la obtención de numerosas interacciones aleatorias, o la necesidad de expresión de terceras proteínas o moléculas que favorezcan y permitan la interacción.

Mientras que este trabajo describe un gran número de posibles interacciones entre un amplio grupo de proteínas de membrana de *A. thaliana*, será necesario el uso de otras aproximaciones experimentales que corroboren dichas interacciones tanto en otros sistemas heterólogos como en planta que permitirán desvelar su función molecular y fisiológica.

Aunque con los conocimientos que se tienen en la actualidad es prácticamente imposible aventurar el significado biológico de la mayoría de las interacciones descritas en este trabajo, sí es posible, sin embargo, proponer posibles funciones para algunas de las interacciones que se describen a continuación.

Interacciones entre las acuaporinas de *A. thaliana*.

El grupo de proteínas ensayado contiene 24 miembros de esta familia que están implicados principalmente en el transporte de moléculas de agua a través de las membranas. El ensayo a gran escala reveló la existencia de un número abundante de interacciones entre los miembros de esta familia con una presencia relevante de las poco frecuentes interacciones recíprocas que aparecen en los ensayos de dos híbridos.

El análisis más detallado fue para la subfamilia PIP que engloba acuaporinas localizadas mayoritariamente en la membrana plasmática (Figura 24).

Entre las interacciones obtenidas con las acuaporinas PIP se observa que existen interacciones que podrían reflejar la importancia de la formación de distintos y heterogéneos heterotetrámeros cuya función y composición fuera dependiente de las necesidades celulares y condiciones ambientales (Maurel *et al.*, 2007, 2008). Este tipo de interacciones son homólogas a las descritas para otros vegetales como *Mimosa pudica* (Temmei *et al.*, 2005), maíz (Zelany *et al.*, 2007) o espinaca (Fotiadis *et al.*, 2000).

En términos generales, el ensayo SU realizado en este trabajo indica una promiscua existencia de interacciones entre las proteínas PIP de *A. thaliana* que, se presupone por homología con otros organismos, son la base para la formación de las estructuras tetraméricas que confieren estabilidad a los poros transportadores y permite su regulación de una forma coordinada.

De los resultados obtenidos con los miembros de otras familias de las acuaporinas merece la pena destacar las interacción detectadas entre algunas de las proteínas AtNIP que presentan reciprocidad y participan en el transporte de sustancias tóxicas.

Interacciones de las proteínas transportadoras de nitratos.

En *A. thaliana* existen dos grandes familias relacionadas con el transporte de nitratos denominadas NTR1 y NTR2 (Tsay *et al.*, 2007).

En este trabajo se han detectado 133 interacciones en las que están involucradas las 13 proteínas de las familias NTR1 y NTR2 incluidas en el grupo ensayado (Figura 25). Entre estas interacciones se destacan algunas de ellas por su importancia biológica.

Interacciones de proteínas de la superfamilia VIC (Voltage-gated Ion Channel).

La superfamilia proteica VIC está compuesta por proteínas que forman canales iónicos, que transportan, con mayor o menor selectividad, cationes monovalentes y principalmente K^+ , Na^+ , Ca^{2+} . Estas proteínas están relacionadas con multitud de funciones celulares como procesos osmóticos, morfogénicos y de respuesta a patógenos al estar involucradas en procesos relacionados con la homeostasis iónica en plantas (Talke *et al.*, 2003; Borsics *et al.*, 2006). Su expresión es ubicua y ha podido ser localizada en distintas estructuras de la planta como raíces, hojas o embrión (Christopher *et al.*, 2007; Chin *et al.*, 2009).

Los miembros de esta superfamilia proteica pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Proteínas que forman parte de los canales iónicos regulados/dependientes de nucleótidos cíclicos (CNGC) que, además de ser responsables del transporte de cationes, también median en el transporte de metales como Li^+ , Cs^+ , Rb^+ , Pb^{2+} y Mg^{2+} , e incluso en ciertos casos de iones amonio (Sunkar *et al.*, 2000; Leng *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2007; Chin *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010).
- Proteínas componentes de los transportadores de potasio tipo Shaker y que engloba a las proteínas de las familias AKT/KAT y KCO.

En el ensayo realizado se han analizado un total de 21 proteínas VIC, 13 pertenecientes a canales iónicos CNGC y 8 a transportadores de potasio tipo Shaker que en conjunto participan en un total de 174 interacciones.

Entre estas interacciones destacan por su relevancia aquellas que implican proteínas CNGC como son las interacciones entre miembros de la propia familia CNGC, interacciones de CNGC con proteína quinasas, e interacciones entre CNGC con calmodulinas (Figura 26).

Las interacciones entre proteínas de la familia CNGC han sido ya descritas en distintos organismos, entre los que se incluyen plantas, donde se ha comprobado que responden a la formación de complejos heterotetraméricos o heteromultiméricos (Kramer *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007). En plantas se ha propuesto que la formación de los complejos tetraméricos permiten la sincronización de la apertura y cierre de los canales llevando a cabo su función de una manera cooperativa (Talke *et al.*, 2003).

Aunque el ensayo SU no puede detectar la interacción simultánea de más de dos proteínas, este trabajo sí soporta la existencia de los complejos multiméricos CNGC a través de la identificación de interacciones cruzadas entre la mayoría de los miembros de esta familia.

Varias proteínas CNGC, interaccionan con proteína quinasas. Estas interacciones sugieren que las proteínas CNGC de *A. thaliana* están sujetas a mecanismos de fosfo/desfosforilación que regulan su actividad transportadora de iones a semejanza de lo que ocurre en células de mamíferos (Kramer *et al.*, 2001).

Además, la mayoría de las quinasas involucradas son Ser/Thr proteína quinasas dependientes de calcio.

Por último se han detectado interacciones con varias calmodulinas que, al igual que sucede en otros organismos, pueden ejercer un efecto inhibitor sobre el transporte de iones en la célula (Hua *et al.*, 2003; Borsics *et al.*, 2006).

Interacciones de la familia de los antiporters monovalentes catión: protón (NHX).

Las proteínas de la familia NHX son canales transportadores de tipo antiporter que realizan mayoritariamente un transporte del tipo Na^+/H^+ pudiendo transportar otros iones como K^+ o Li^+ . Se pueden localizar en distintas membranas celulares como la plasmática, la vacuolar u otras membranas intracelulares.

En el trabajo realizado se han estudiado un total de 7 proteínas NXH que han permitido detectar 96 interacciones positivas (Figura 27).

Entre los miembros analizados de esta familia proteica se encuentra la proteína AtNHX1 que es objeto de controversia respecto a la localización de su extremo carboxilo ya que algunos autores proponen que se localiza en el lumen de las vacuolas (Yamaguchi *et al.*, 2005) mientras que otros sugieren un emplazamiento citosólico (Sato *et al.*, 2005). En este trabajo se ha podido comprobar que AtNHX1 supera el control positivo, y que es capaz de interaccionar con el dominio Nub silvestre citoplasmático, por lo que se descarta la posición

intravacuolar de su extremo carboxilo. Los otros miembros de las proteínas NHX también presentan extremos carboxilo terminales localizados citoplasmáticamente que permiten el ensayo SU (Pardo *et al.*, 2006).

De acuerdo a sus implicaciones biológicas las interacciones de las proteínas NHX pueden clasificarse en diferentes grupos.

Se han detectado 3 interacciones entre las proteínas de la familia NHX que sugieren que estas proteínas se agrupan en estructuras heteroméricas para formar los distintos transportadores funcionales. La constitución heteromérica de los transportadores podría ser la base de mecanismos de regulación de un proceso de gran importancia fisiológica como es el del mantenimiento de la homeostasis del pH intracelular.

Otro grupo de interacciones relevantes han sido detectadas entre proteínas AtNHX y ciertas GTPasas.

Interacciones de la familia de las permeasas de purinas.

Las permeasas de purinas son una familia de proteínas que se localizan principalmente en la membrana plasmática donde median en el transporte contragradiante simporte, acoplado al transporte de protones, de bases púricas y otros compuestos estructuralmente relacionados como cafeína, nicotina y citoquininas (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkler *et al.*, 2003).

En el ensayo SU se han obtenido 199 interacciones en las que participan 15 permeasas de purinas (PUP) (Figura 28).

De forma similar a lo que se ha descrito en otras familias de transportadores, también se han detectado numerosas interacciones entre las permeasas de purinas analizadas. Estas interacciones revelan la existencia de transportadores formados por estructuras homo o heteroméricas con las ventajas que tienen estos complejos respecto a su estabilidad, especificidad y regulación. De las 11 interacciones detectadas entre los miembros de la familia de las permeasas de purinas, solamente dos, habían podido ser pronosticadas previamente por métodos bioinformáticos.

Relacionado con su papel en el transporte de citoquininas, un número significativo de los miembros de la familia PUP interactúan con proteínas involucradas en las rutas de señalización de citoquininas como son HP o RR (To *et al.*, 2007). Supuestamente, este tipo de interacciones pueden permitir que las proteínas de las rutas de señalización de citoquininas

estén interconectadas desde la primera etapa, en la que se importan las moléculas efectoras al interior celular.

Por último, el hecho de que algunas proteínas PUP interaccionen con las proteína quinasas lo que sugiere que la función de las permeasas de purinas está regulada por mecanismos de fosforilación como ocurre en otros sistemas implicados en respuestas a estrés salino (Hsu *et al.*, 2009).

Análisis de las interacciones obtenidas con los transportadores de auxinas.

La auxina es una fitohormona que influye en muchos procesos centrales del desarrollo en plantas como la embriogénesis, la organogénesis, la diferenciación y la regeneración tisular (Mravec *et al.*, 2008). En este trabajo se han analizado las interacciones de 14 proteínas implicadas en el transporte de auxinas a través de las membranas celulares y que representan a las tres familias conocidas: AUX1/LAX, PIN y PGP/MDR (Titapiwatanakun *et al.*, 2009).

Las 74 interacciones detectadas en el ensayo SU muestran la existencia de una clara relación entre los transportadores de auxinas de las familias PIN y AUX/LAX y los

transportadores de purinas y citoquininas PUP (Figura 29). Una explicación a la relación existente a nivel de los transportadores de estas dos clases de moléculas efectoras consiste en que el balance entre citoquininas y auxinas es un factor esencial para el correcto desarrollo de las plantas a través de efectos sinérgicos, antagonistas e incluso aditivos que dependen del tejido o del estado del desarrollo (Skoog *et al.*, 1957; Kakani *et al.*, 2009). Entre otros posibles mecanismos destinados a la modulación de la acción de citoquininas y auxinas, la existencia de interacciones entre los transportadores de ambos tipos de moléculas plantea una atractiva hipótesis de regulación de transporte coordinado basado en interacciones físicas directas entre ambos (Fukaki *et al.*, 2009; Moubayidin *et al.*, 2009; Persinová *et al.*, 2009; Fukaki *et al.*, 2009; Bishopp *et al.*, 2011; Plet *et al.*, 2011).

Es también notorio que en el ensayo SU no hayan podido detectarse interacciones entre los transportadores de auxinas de la familia PGP con los de la familia PIN, ni con proteínas calmodulinas o la propil isomerasa asociada a membrana AtTWD1 a pesar de que esas interacciones han sido demostradas mediante otras aproximaciones experimentales (Geisler *et al.*, 2003; Popescu *et al.*, 2007; Mravec *et al.*, 2008).

Interacciones de la superfamilia APC (Amino Acid-Polyamine-Organocation).

En esta superfamilia se engloban proteínas de cuatro familias distintas, proteínas CAT (Cationic Amino Acid Transporter), LAT (L-type Amino Acid Transporter), GDU (Glutamine Dumper) y AAAP (Amino Acid/Auxin Permease).

Este grupo proteico dio lugar a 247 interacciones (Figura 30).

Existen diversos trabajos que concluyen que la conformación de las proteínas AAAP en la membrana plasmática presenta un extremo carboxilo localizado extracelularmente (Chen *et al.*, 2001; Okumoto *et al.*, 2002; Wipf *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010). A pesar de que este tipo de organización estructural es incompatible con un resultado positivo en el ensayo SU, algunas de las proteínas AAAP consideradas en este trabajo son capaces de superar el control positivo, lo que implica que la interacción de los dominios Cub y Nub tiene lugar en el citoplasma. Existen varias explicaciones que soportarían que el resultado de estas interacciones en el ensayo SU son artefactos (p.ej.: conformación alterada de la estructura de

la proteína en la levadura o interacciones ocurridas durante el proceso de transporte a la membrana).

Entre las interacciones en que se hallan implicadas las 8 proteínas de la familia CAT ensayadas destacan aquellas que tienen lugar con proteína quinasas. La presencia en las proteínas CAT de residuos susceptibles de fosforilación por proteína quinasas añade verosimilitud a dichas interacciones. Por otra parte, la fosforilación de las proteínas CAT por quinasas específicas podría ser un mecanismo esencial en la regulación de estos canales proteicos de forma similar a lo que ocurre en células humanas (Gräf *et al.*, 2001).

Además de las interacciones de las proteínas CAT con proteína quinasas, también son relevantes las interacciones detectadas con los miembros de la familia GDU. Las proteínas GDU presentan varias interacciones con otros transportadores de aminoácidos con los que podrían formar complejos proteicos que mediasen el transporte aminoacídico. Recientemente, se ha propuesto que debido a la estructura atípica de las proteínas GDU, la relación de estas con el transporte de aminoácidos no es el resultado de la formación, por sí solas, de un transportador sino que se propone que estas proteínas puedan ser subunidades de un transportador mayor formado por otras proteínas transportadoras de aminoácidos, en donde las GDU podrían ejercer una función transportadora, sensora, o incluso estar involucradas en la correcta localización de los complejos transportadores de aminoácidos (Pilot *et al.*, 2004; Pratelli *et al.*, 2010; Okumoto *et al.*, 2011).

Familia MLO (Mildew resistance Locus O).

Ciertas funciones esenciales de las plantas, como son la respuesta a patógenos, la muerte celular programada en respuesta a estrés, la reorganización de las fibras de actina y la elongación celular, están determinadas por receptores de membrana. Algunos de estos receptores, denominados MLO (Mildew resistance Locus O), fueron inicialmente identificados porque su delección confiere resistencia a determinados hongos ascomicetos y caracterizados como proteínas con siete regiones transmembrana y un dominio de unión a calmodulina que permite la regulación por calcio (Devoto *et al.*, 1999, 2003; Opalski *et al.*, 2005; Consonni *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006, 2009).

Las 64 interacciones en las que se hallan implicadas las 8 proteínas de la familia MLO (AtMLO1, 3, 4, 6, 7, 11-13) muestran una compleja red compuesta por interacciones entre proteínas de la misma familia, interacciones con calmodulinas e interacciones con proteína quinasas dependientes de calcio ((Figura 31).

Esta red de interacciones refleja que en *Arabidopsis* existe un escenario similar al descrito para la familia MLO de otras especies vegetales como cebada y arroz (Elliott *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Aunque la función biológica de las proteínas MLO no es conocida, se supone que el hongo patógeno aprovecha la presencia de la proteína MLO para suprimir los mecanismos de defensa de la planta contra la infección. Estos mecanismos de defensa requieren, entre otros, un citoesqueleto de actina intacto (Opalski *et al.*, 2005), la interacción de la proteína MLO con la calmodulina (Kim *et al.*, 2002) y la activación de proteína quinasas dependientes de calcio (Freymark *et al.*, 2007; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2009).

Las interacciones de las proteínas MLO detectadas en el ensayo SU responden a estos requerimientos y soportan la idea de que las proteínas MLO constituyen o forman parte de un

sistema de señalización de calcio implicado en las interacciones planta-patógeno (Kim *et al.*, 2002; Devoto *et al.*, 2003).

V. Conclusiones

V. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un método para el análisis a nivel “ómico” de las interacciones entre proteínas de membrana basado en el ensayo de la “Split Ubiquitin” y la formación de diploides de cepas de levadura de tipo de apareamiento opuesto.
- El control de la expresión de la proteína cebo fusionada al dominio Cub-PLV mediante un promotor reprimible, *Met25*, permite efectuar el ensayo SU con distintos grados de estringencia y discriminar eficazmente las interacciones positivas de los falsos positivos y los falsos negativos.
- El ensayo SU con el que se han analizado más de 70000 interacciones entre 413 proteínas presa y 173 proteínas de membrana cebo de *A. thaliana*, ha revelado la existencia de 1427 posibles nuevas interacciones en el interactoma de este organismo modelo y aporta nueva información sobre la función de numerosas proteínas y complejos proteicos.
- La descripción del interactoma de *A. thaliana* está lejos de estar saturada ya que el grado de solapamiento entre las interacciones descritas en las diferentes bases de datos es muy bajo. En el caso concreto de los resultados obtenidos en este trabajo, el solapamiento con interacciones derivadas de aproximaciones experimentales es únicamente del 15,4%.
- La adición del dominio Nub al extremo amino terminal de las proteínas presa permite detectar interacciones que no son detectadas con proteínas presa que poseen el dominio Nub fusionado a su extremo carboxilo y elimina una de las restricciones experimentales del ensayo SU.
- El análisis de algunas de la familias de proteínas implicadas en el ensayo, como transportadores de nitratos, permeasas de purinas, transportadores de auxinas, canales iónicos, transportadores de cationes monovalentes, proteínas transportadoras de aminoácidos y receptores de membrana de tipo MLO, revela la existencia frecuente de complejos homo y heteroméricos entre las proteínas de una misma familia así como la interacción con proteína quinasas. La interacción de proteína quinasas con los

complejos transportadores sugiere que su función de transporte o de sensor de metabolitos está regulada por mecanismos de fosforilación.

- Las interacciones entre miembros de la subfamilia PIP de las acuoporinas dan lugar a un complejo entramado de uniones que revela la formación de múltiples y diferentes complejos proteicos cuya función y composición parece ser dependiente de las necesidades celulares y condiciones ambientales.

VI. Materiales y métodos

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO

VI.1.1. Cepas de *E. coli*.

En la siguiente tabla se recogen las distintas cepas bacterianas empleadas, su genotipo y su procedencia.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
DH10B	<i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>dlacZDM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>end1A</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , D(<i>ara</i> , <i>leu</i>) 7697 <i>araD139</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>F'</i> (<i>traD36lacI9</i> , <i>lacZ</i> Δ <i>ml5 proAB+</i>)	Messing <i>et al.</i> , 1981
DH5 α	<i>sup E</i> , <i>thi</i> Δ <i>lacUI69</i> (ϕ 80 <i>dlacZDM15</i>), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> .	Hanahan., 1983

Tabla 9: Cepas bacterianas

VI.1.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

En la siguiente tabla se recogen las distintas cepas de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo, su genotipo y su procedencia.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
CEN.PK113-6B	<i>Mata ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-289</i>	Prof. Dr. K.D. Entian
CEN.PK113-17D	<i>Mat</i> α <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>his3</i> Δ 1	Prof. Dr. K.D. Entian
THY.AP4 (Y-512)	<i>Mata ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>lexA::lacZ::trp1</i> , <i>lexA::HIS3</i> , <i>lexA::ADE2</i>	Hamacher, Obrdlik <i>et al</i> este trabajo
THY.AP5 (Y-545)	<i>Mat</i> α <i>URA3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>loxP::ade2</i>	Hamacher, Obrdlik <i>et al</i> este trabajo
Y-546	THY.AP5 pXNgate21	Este trabajo
Y-547	THY.AP5 pNXgate32	Este trabajo
Y-548	THY.AP4 pMetYCGate	Este trabajo
Y-549	THY.AP4 pTETCub	Este trabajo
Y-551	THY.AP5 pNUbWT2	Este trabajo
Y-565	THY.AP5 pNXgate33Ha	Este trabajo
Y-566	THY.AP5 pXNgate3Ha	Este trabajo

Tabla 10: Cepas de levadura

Debido a la importancia para este trabajo, se detalla la construcción de las cepas THY.AP4 y THY.AP5.

La cepa THY.AP4 deriva de la cepa CEN.PK113-6B (*Mata, ura3-52, leu2-3,112, trp1-289*). Para su construcción fue necesario el reemplazamiento de la región promotora del gen *HIS3* por la secuencia denominada “promotor-operador *lexA*” la cual lleva las secuencias de reconocimiento específicas de la proteína *lexA*. Para llevar a cabo este reemplazamiento, en primer lugar se amplificó por medio de una reacción de PCR el módulo *loxP-KanMX-loxP* del plásmido PUG6 (Güldener *et al.*, 1996) utilizando los oligonucleótidos específicos (olilexHIS1 y oliFUS2) los cuales añadieron a la secuencia amplificada extremos recombinogénicos; por un lado el oligonucleótido olilexHIS1 añade una región homóloga al promotor *HIS3* y por el otro el oligonucleótido oliFUS2 añade una secuencia complementaria al “promotor-operador *lexA*” derivado del plásmido *lexAox5LacZ* (Ruden *et al.*, 1991).

Tras esta primera amplificación, se realizó una segunda PCR para obtener la secuencia del “promotor-operador *lexA*”. Se utilizó como molde el plásmido integrativo *lexAox5LacZ* y los oligonucleótidos (oliFUS3 y olilexHIS4) que añadían a esta amplificación secuencias homólogas al inicio del gen *HIS3* por un lado y por el otro al extremo de la primera PCR.

Los productos de PCR de estas amplificaciones se utilizaron para transformar la cepa CEN.PK113-6B. Posteriormente se seleccionó un transformante con resistencia a geneticina y auxótrofo para histidina que confirmó la correcta sustitución del promotor *HIS3* por el promotor *lexA*.

Esta nueva cepa fue transformada con el plásmido pSH47 (Güldener *et al.*, 1996) que lleva la secuencia codificante de la recombinasa Cre. Esta recombinasa reconoce las secuencias *loxP* y promueve el corte y la escisión de la secuencia de ADN existente entre dos secuencias *loxP*. Se picaron distintos transformantes seleccionándose aquellos que no presentaron crecimiento en un medio con geneticina. La resistencia a la geneticina se pierde tras la actuación de la recombinasa Cre.

Por último para la eliminación del plásmido pSH47, que rescata la auxotrofia para uracilo, se creció la cepa transformante en medio rico y posteriormente se seleccionaron cepas capaces de crecer en un medio suplementado con 5'FOA. La comprobación de la correcta sustitución del promotor *HIS3* por el promotor *lexA* se llevó a cabo mediante una PCR analítica, utilizando oligonucleótidos específicos (oliHis3a, oliHis3b). La amplificación se secuenció ratificando así que la cepa obtenida tenía la integración esperada.

Para el reemplazamiento del promotor *ADE2* se siguió la misma estrategia que la utilizada para el reemplazamiento del promotor *HIS3*. En este caso la zona sustituida abarca la zona

que precede al inicio de la secuencia codificante del gen *ADE2* desde el nucleótido -498 hasta el -1 y los oligonucleótidos específicos utilizados (olilexADE1, olilexADE4) tienen secuencias homólogas al inicio y al fin del promotor *ADE2*. Los oligonucleótidos utilizados para la comprobación del correcto reemplazamiento fueron los oligonucleótidos oliADE2a y oliADE2b.

Para la inserción del gen de la β -galactosidasa bajo el “promotor-operador *lex A*”, se siguió la estrategia anteriormente presentada y se sustituyó el gen *TRP1* mutado de la cepa CEN.PK113-6B por la construcción *lexApromotor-lacZ*. Esta secuencia ha sido amplificada utilizando como molde el vector *lexAox5LacZ*. Los oligonucleótidos utilizados (oliTRP1lac1, oliTRP1lac2, oliTRP1lac3, oliTRP1lac4) añaden dos secuencias recombinogénicas: una parte de la secuencia promotora del gen *TRP1* y la otra con la secuencia terminadora de este mismo gen. Para comprobar que la transformación era correcta se utilizaron los oligonucleótidos, oliTRP1a y oliTRP1b.

Para la construcción de la cepa THY.AP5 se partió de la cepa CEN.PK113-17D (*Mata leu2-3, 112, trp1-289, his3-Δ1*). La cepa CEN.PK113-17D se modificó para que presentara auxotrofia para la adenina, al necesitarse esta auxotrofia para el desarrollo del sistema SU diseñado. Para llevar a cabo esta modificación, se realizó una reacción de PCR en la cual se amplificó la secuencia *loxP-KanMX-loxP* del plásmido PUG6. Los oligonucleótidos empleados (olilexADE2 y oliS2-ADE2) aportaban a la amplificación secuencias homólogas al gen *ADE2* para conseguir, por recombinación homóloga, el reemplazamiento de este gen por la secuencia amplificada. Con este fragmento de ADN se transformó la cepa CEN.PK113-17D seleccionándose en un medio suplementado con geneticina. Tras esta primera selección se comprobó que esta cepa transformante era auxótrofa para la adenina.

Para eliminar la secuencia que confiere resistencia a geneticina se transformó con el plásmido pSH65, el cual lleva la secuencia que codifica para la recombinasa Cre y lleva el marcador de selección Tn5ble que confiere resistencia a phleomicina. En primer lugar se seleccionaron las cepas que pierden la resistencia a geneticina y posteriormente, tras varias siembras en medio rico, se eligieron aquellas que han perdido su resistencia a fleomicina. Se comprobó la correcta delección del gen *ADE2* por medio de una PCR analítica utilizando los oligonucleótidos oliA1-ADE2 y el oliA4-ADE2.

Las cepas THY.AP4 y THY.AP5 fueron transformadas siguiendo el método Trafo (Gietz., 2002) con los plásmidos linearizados pMetYCGate y pNXgate, respectivamente, junto a las

amplificaciones de los ORF de *A. thaliana* utilizados en este trabajo, que están flanqueados por las secuencias recombinogénicas B1 y B2 homólogas a las existentes en los plásmidos utilizados.

El vector pMetYCgate fue linearizado con las endonucleasas de restricción *PstI* y *HindIII* que cortan únicamente en el marcador de resistencia a la geneticina obteniendo como resultado dos bandas, una mayor de 9,3 Kb y otra menor de 0,7 Kb. La banda de mayor tamaño fue la utilizada para la transformación.

El vector pNXgate fue digerido con las endonucleasas de restricción *SmaI* y *EcoRI*, las cuales cortan en el módulo KanMX, liberando dos bandas una superior de 6,6 Kb y otra más pequeña de 1,4 Kb. Se seleccionó la banda superior para la transformación.

Para la selección de las cepas transformantes se utilizaron los siguientes medios selectivos: en el caso de la cepa THY.AP5 transformada con el plásmido pXNgate el medio era carente de triptófano y en las cepas THY.AP4 transformadas con pMetYCgate el medio no llevaba leucina.

Con el propósito de corregir la introducción de mutaciones puntuales que pudieran generarse en el proceso de amplificación y/o clonación (proceso de transcripción reversa, amplificación por PCR o el proceso de recombinación *in vivo*) (Petracek *et al.*, 2002) y que pueden afectar severamente a la conformación de la proteína codificada por los ORF amplificados, se picaron entre 20-50 colonias sensibles a geneticina de cada una de las transformaciones. La sensibilidad a geneticina elimina aquellas colonias transformantes en las que se ha introducido el plásmido sin digerir y por tanto no expresan la proteína de interés.

Se comprobó por medio de PCRs analíticas que cada mezcla o “pool” de colonias tenía el plásmido adecuado. Las cepas obtenidas se representan en la tabla 11:

NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS		NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS	
		MetYCgate	Xnub			MetYCgate	Xnub
At1g01340	AtCNGC10/AtCBK1	X	X	At1g30220	AtINT2	X	X
At1g01580	AtFRO2	X	X	At1g30400	AtMRP1		X
At1g02510	AtKCO4/AtTPK4	X	X	At1g30840	AtPUP4	X	X
At1g03430	AtAHP5		X	At1g31820	AtLAT3		X
At1g04310	AtERS2	X	X	At1g31830	AtLAT4	X	X
At1g04760	AtVAMP726	X	X	At1g31880	AtBRX	X	X
At1g05030			X	At1g32230	AtRCD1		X
At1g05940	AtCAT9	X	X	At1g33110	AtDTX21		X
At1g07340	AtSTP2	X	X	At1g34580	AtSTP5		X
At1g07670	AtECA4		X	At1g35160	AtGRF4/AtGF14phi		X
At1g07810	AtECA1/AtACA3		X	At1g35720	AtAnn1		X
At1g08090	AtNRT2.1/AtACH1	X	X	At1g44100	AtAAP5		X
At1g08230	AtGAT1		X	At1g45170		X	X
At1g08890			X	At1g47670	AtLHT4/AtAATL1		X

NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS		NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS	
		MetYcgate	Xnub			MetYcgate	Xnub
At1g08900		X	X	At1g48270	AtGCR1	X	X
At1g08920	AtESL1		X	At1g50310	AtSTP9		X
At1g08930	AtERD6	X	X	At1g51340	AtDTX42	X	X
At1g08960	AtCAX11	X	X	At1g51460	AtWBC13	X	X
At1g09860	AtPUP16	X	X	At1g51500	AtWBC12/AtCER5	X	X
At1g09960	AtSUT4/AtSUC4		X	At1g51740	AtSYP81/AtUFE1		X
At1g10010	AtAAP8		X	At1g53270	AtWBC10	X	X
At1g10130	AtECA3-AtACA6		X	At1g54350	AtPMP1	X	X
At1g11000	AtMLO4	X	X	At1g54370	AtNHX5		X
At1g11260	AtSTP1		X	At1g55730	AtCAX5		X
At1g11670	AtDTX36		X	At1g57943	AtPUP17	X	X
At1g12110	AtNRT1.1/AtCHL1	X	X	At1g58030	AtCAT2	X	X
At1g12360	KEULE,AtKEU		X	At1g58340	AtDTX48		X
At1g12940	AtNRT2.5		X	At1g58360	AtAAP1/AtNAT2		X
At1g12950	AtDTX31		X	At1g61270	AtLHT3		X
At1g14660	AtNHX8	X	X	At1g61560	AtMLO6	X	X
At1g15880	AtGOS11	X	X	At1g64740	AtTUA1		X
At1g16010	AtMRS2-1/AtMGT2		X	At1g65380	AtRLP10/AtCLV2	X	X
At1g16240	AtSYP51		X	At1g66150	AtTMK1		X
At1g17260	AtAHA10		X	At1g66410	AtCaM4		X
At1g17810	AtTIP3.2/BETA-TIP	X	X	At1g66570	AtSUC7		X
At1g17840	AtWBC11	X	X	At1g66760	AtDTX9		X
At1g18890	AtCDPK10-AtCDPK1		X	At1g66780	AtDTX8		X
At1g19450	F18O14.22, F18O14_22	X	X	At1g67640	AtLHT5		X
At1g19770	AtPUP14	X	X	At1g68740	AtPHO-H1		X
At1g20840	AtAZT1/AtTMT1		X	At1g69270	AtRPK1	X	X
At1g21250	AtWAKL1, PRO25, WAK1		X	At1g70610	AtTAP1	X	X
At1g22550		X	X	At1g70940	AtPIN3	X	X
At1g22570		X	X	At1g71140	AtDTX14		X
At1g22710	AtSUC2	X	X	At1G71870	AtDTX54		X
At1g23080	AtPIN7		X	At1g71880	AtSUC1		X
At1g24400	AtLHT2		X	At1g73590	AtPIN1	X	X
At1g26440	AtUPS5		X	At1g74530			X
At1g26480	AtGRF12/AtGF14iota		X	At1g75470	AtPUP15		X
At1g26670	AtVTI12	X	X	At1g75820	AtCLV1		X
At1g28220	AtPUP3	X	X	At1g77110	AtPIN6	X	X
At1g28230	AtPUP1	X	X	At1g77210	AtSTP14		X
At1g28490	AtSYP61/AtOSM1		X	At1g77380	AtAAP3		X
At1g29310	AtSec61		X	At1g77690	AtLAX3		X
At1g78300	AtGRF2/AtGF14omega		X	At2g37360	AtWBC2		X
At1g78720			X	At2g38120	AtAUX1	X	X
At1g79610	AtNHX6	X	X	At2g38170	AtCAX1		X
At1g79940		X	X	At2g38290	AtAMT2.1		X
At1g80510			X	At2g38460	AtFPN1		X
At1g80760	AtNIP6.1/AtNLM7	X	X	At2g38510	AtDTX53		X
At1g80900	AtMRS2-10/AtMGT1		X	At2g38750	AtAnn4		X
At2g01420	AtPIN4	X	X	At2g38760	AtAnn3		X
At2g02020	AtPTR4	X	X	At2g38940	AtPT2/AtPHT4		X
At2g02040	AtNTR1/PTR2-B	X	X	At2g39010	AtPIP2.6	X	X
At2g02860	AtSUT2/AtSUC3	X	X	At2g39130		X	X
At2g02930	AtGSTF3		X	At2g39200	AtMLO12	X	X
At2g03590	AtUPS1	X	X	At2g39350	AtWBC1		X
At2g04050	AtDTX3		X	At2g39480	AtMDR6		X
At2g04100	AtDTX6		X	At2g39770	AtCYT1/AtGMP1		X
At2g05630	AtATG8d		X	At2g39890	AtProT1		X
At2g07560	AtAHA6		X	At2g40420			X
At2g13650	AtGONST1	X	X	At2g40940	AtERS1	X	X
At2g14670	AtSUC8		X	At2g41110	AtCaM2		X
At2g17260	AtGLR3.1		X	At2g41140	AtCRK1	X	X
At2g17430	AtMLO7	X	X	At2g41190			X
At2g18480	AtPLT3		X	At2g41560	AtACA4		X
At2g18790	AtPHYB		X	At2g42590	AtGRF9/AtGF14-mu		X
At2g18960	AtAHA1		X	At2g43130	AtRAB-A5c		X
At2g20780	AtPLT4	X	X	At2g45200	AtGOS12	X	X
At2g21050	AtLAX2		X	At2g45960	AtPIP1.2/AthH2	X	X

NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS		NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS	
		MetYcgate	Xnub			MetYcgate	Xnub
At2g21230			X	At2g46430	<i>AtCNGC3</i>	X	X
At2g23150	<i>AtNRAMP3</i>		X	At2g46440	<i>AtCNGC11</i>	X	X
At2g24220	<i>AtPUP5</i>	X	X	At2g46450	<i>AtCNGC12</i>	X	X
At2g24610	<i>AtCNGC14</i>	X	X	At2g47600	<i>AtMHX1</i>	X	X
At2g24762	<i>AtGDU4</i>	X	X	At3g01090	<i>AtSnRK1;1/AtAKIN10</i>		X
At2g25810	<i>AtTIP4.1</i>	X	X	At3g03720	<i>AtCAT4</i>	X	X
At2g26300	<i>AtGPA1</i>		X	At3g04090	<i>AtSIP1.1</i>	X	X
At2g26330	<i>AtERECTA</i>		X	At3g04110	<i>AtGLR1.1</i>		X
At2g26650	<i>AtAKT1</i>		X	At3g04580	<i>AtEIN4</i>		X
At2g26690	<i>AtNRT1.4</i>	X	X	At3g05030	<i>AtNHX2</i>	X	X
At2g27030	<i>AtCAM5/TCH1</i>		X	At3g05160		X	X
At2g28070	<i>AtWBC3</i>		X	At3g05165			X
At2g29100	<i>AtGLR2.9</i>		X	At3g05350			X
At2g29650	<i>AtANTR1</i>		X	At3g05400			X
At2g30980	<i>AtASK-dzeta</i>		X	At3g05710	<i>AtSYP43</i>		X
At2g32390	<i>AtGLR3.5</i>		X	At3g06100	<i>AtNIP7.1/AtNLM8</i>	X	X
At2g32400	<i>AtGLR3.7</i>		X	At3g06370	<i>AtNHX4</i>	X	X
At2g33120	<i>AtVAMP722</i>	X	X	At3g07520	<i>AtGLR1.4</i>		X
At2g33750	<i>AtPUP2</i>	X	X	At3g07880	<i>AtRhoGDI1</i>		X
At2g34250			X	At3g08040	<i>AtDTX43/AtFRD3</i>		X
At2g34390	<i>AtNIP2.1/AtNLM3</i>	X	X	At3g09740	<i>AtSYP71</i>		X
At2g34960	<i>AtCAT5</i>		X	At3g10600	<i>AtCAT7</i>	X	X
At2g36590	<i>AtProT3</i>		X	At3g10660	<i>AtCPK2</i>		X
At2g36830	<i>AtTIP1.1</i>	X	X	At3g11820	<i>AtSYP121/AtSYR1</i>		X
At2g36900	<i>AtMEMB11</i>	X	X	At3g11900	<i>AtANT1</i>		X
At2g36910	<i>AtMDR/AtPGP1</i>	X	X	At3g13620	<i>AtLAT2</i>		X
At2g37170	<i>AtPIP2.2</i>	X	X	At3g14070	<i>AtCAX9</i>	X	X
At2g37180	<i>AtPIP2.3/AtRD28</i>	X	X	At3g15730	<i>AtPLDa1</i>		X
At3g16240	<i>AtTIP2.1</i>	X	X	At4g02520	<i>AtGSTF2</i>		X
At3g17440	<i>AtNPSN13</i>	X	X	At4g02600	<i>AtMLO1</i>		X
At3g17510	<i>AtCIPK1/AtSnRK3.16</i>		X	At4g03330	<i>AtSYP123</i>		X
At3g17700	<i>AtCNGC20/AtCNBT1</i>		X	At4g03560	<i>AtTPC1</i>	X	X
At3g18830	<i>AtPLT5</i>	X	X	At4g04760		X	X
At3g19553	<i>AtLAT5</i>		X	At4g04910	<i>AtNSF</i>		X
At3g19930	<i>AtSTP4</i>		X	At4g08700	<i>AtPUP13</i>	X	X
At3g21640	<i>AtTWD1/AtFKBP42</i>	X	X	At4g09000	<i>AtGRF1/AtGF14chi</i>		X
At3g21690	<i>AtDTX40</i>		X	At4g10380	<i>AtNIP5.1/AtNLM6</i>	X	X
At3g23430	<i>AtPHO1</i>		X	At4g12730	<i>AtFLA2</i>		X
At3g23550	<i>AtDTX18</i>		X	At4g14640	<i>AtCAM8</i>		X
At3g24290	<i>AtAMT1.5</i>	X	X	At4g17340	<i>AtTIP2.2</i>	X	X
At3g24300	<i>AtAMT1.3</i>	X	X	At4g17615	<i>AtCBL1</i>		X
At3g26520	<i>AtTIP1.2</i>	X	X	At4g17730	<i>AtSYP23/AtPLP</i>		X
At3g27170	<i>AtCLC-b</i>		X	At4g18160	<i>AtKCO6</i>		X
At3g28860	<i>AtPGP19/AtMDR1</i>	X	X	At4g18190	<i>AtPUP6</i>	X	X
At3g29100	<i>AtVTI13</i>	X	X	At4g18205	<i>AtPUP21</i>	X	X
At3g29160	<i>AtSnRK1.2/AtAkin11</i>		X	At4g18210	<i>AtPUP10</i>	X	X
At3g29350	<i>AtHP1</i>		X	At4g18220	<i>AtPUP9</i>	X	X
At3g30390			X	At4g18710	<i>AtASK-eta</i>		X
At3g42640	<i>AtAHA8</i>		X	At4g18910	<i>AtNIP1.2/AtNLM2</i>	X	X
At3g43810	<i>AtCaM7</i>		X	At4g19030	<i>AtNIP1.1(NLM1)</i>	X	X
At3g45060	<i>AtNRT2.6</i>	X	X	At4g21120	<i>AtCAT1/AtAAT1</i>		X
At3g45290	<i>AtMLO3</i>		X	At4g21380	<i>AtARK3</i>		X
At3g46830	<i>AtRAB-A2c</i>		X	At4g21480	<i>AtSTP12</i>	X	X
At3g46980	<i>AtANTR4</i>		X	At4g21910	<i>AtDTX39</i>		X
At3g47730	<i>AtATH1</i>		X	At4g22790	<i>AtDTX56</i>		X
At3g48100	<i>AtRRR2</i>		X	At4g23030	<i>AtDTX49</i>	X	X
At3g51300	<i>AtROP1</i>		X	At4g23180	<i>AtCRK10/AtDUF26.9</i>	X	X
At3g51800			X	At4g24250	<i>AtMLO13</i>		X
At3g52400	<i>AtSYP122</i>		X	At4g25640	<i>AtDTX35</i>		X
At3g53420	<i>AtPIP2.1</i>	X	X	At4g25760	<i>AtGDU2</i>	X	X
At3g53610	<i>AtRAB-E1a</i>		X	At4g25960	<i>AtMDR2/PGP2</i>		X
At3g54140	<i>AtPTR1</i>	X	X	At4g27585			X
At3g54270	<i>AtSPP3</i>		X	At4g28490	<i>AtHAESA</i>		X
At3g54840	<i>AtARA6/AtRAB-F1</i>		X	At4g28630	<i>AtATM1/AtSTA2</i>	X	X
At3g55090	<i>AtWBC16</i>	X	X	At4g28700	<i>AtAMT1.4</i>		X

NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS		NºAcc.	GENES CLONADOS	PLÁSMIDOS	
		MetYCgate	Xnub			MetYCgate	Xnub
At3g56200			X	At4g29140	<i>AtDTX51</i>		X
At3g56800	<i>AtCaM3</i>		X	At4g30190	<i>AtAHA2</i>		X
At3g56950	<i>AtSIP2.1</i>	X	X	At4g30360	<i>AtCNGC17</i>	X	X
At3g58170	<i>AtBS14a/AtBET11</i>		X	At4g30560	<i>AtCNGC9</i>		X
At3g59030	<i>AtDTX41/AtTT12</i>		X	At4g31730	<i>AtGDU1</i>	X	X
At3g60640	<i>AtAPG8g</i>		X	At4g32150	<i>AtVAMP711</i>	X	X
At3g61430	<i>AtPIP1.1</i>	X	X	At4g32650	<i>AtKC1/AtKAT3</i>	X	X
At3g61650	<i>AtTUBG1</i>		X	At4g33090	<i>AtAPM1</i>	X	X
At3g63420	<i>AtGG1</i>		X	At4g34460	<i>AtGB1</i>		X
At4g00430	<i>AtPIP1.4</i>	X	X	At4g35180	<i>AtLHT7</i>		X
At4g00900	<i>AtECA2/AtACA5</i>		X	At4g35290	<i>AtGLR3.2</i>		X
At4g01010	<i>AtCNGC13</i>	X	X	At4g35300	<i>AtAZT3/AtTMT2</i>		X
At4g01470	<i>AtTIP1.3</i>	X	X	At4g35440	<i>AtCLC-e</i>	X	X
At4g01840	<i>AtKCO5</i>	X	X	At4g35790	<i>AtPLD-delta</i>		X
At4g01900	<i>AtGBL1</i>		X	At4g36760			X
At4g02050	<i>AtSTP7</i>		X	At4g37640	<i>AtACA2</i>		X
At4g02195	<i>AtSYP42</i>		X	At4g39030	<i>AtDTX47/AtEDS5</i>	X	X
At4g39380			X	At5g37810	<i>AtNIP4.1/AtNLM4</i>	X	X
At4g39400	<i>AtBRI1</i>	X	X	At5g39040	<i>AtTAP2</i>	X	X
At5g01240	<i>AtLAX1</i>		X	At5g39340	<i>AtHP2</i>		X
At5g02170			X	At5g39510	<i>AtVTI11/AtZIG/AtSGR4</i>	X	X
At5g02180		X	X	At5g40780	<i>AtLHT1</i>		X
At5g03260	<i>AtLAC11</i>		X	At5g40890	<i>AtCLC-a</i>		X
At5g03610			X	At5g41160	<i>AtPUP12</i>	X	X
At5g03730	<i>AtCTR1</i>		X	At5g41800			X
At5g03910	<i>AtATH12</i>	X	X	At5g43350	<i>AtPT1/AtAPT2/AtPHT1-1</i>		X
At5g04770	<i>AtCAT6</i>	X	X	At5g43610			X
At5g04870	<i>AtCPK1/AtAK1</i>	X	X	At5g44050	<i>AtDTX28</i>		X
At5g05630	<i>AtLAT1</i>		X	At5g46240	<i>AtKAT1</i>	X	X
At5g05760	<i>AtSed5/AtSYP31</i>		X	At5g46370	<i>AtKCO2</i>		X
At5g06680	<i>AtGCP3</i>		X	At5g46860	<i>AtVAM3/AtSYP22/AtSGF</i>	X	X
At5g10220	<i>AtAnn6</i>		X	At5g48400	<i>AtGLR1.2</i>		X
At5g10230	<i>AtAnn7</i>		X	At5g48410	<i>AtGLR1.3</i>		X
At5g11150	<i>AtVAMP713</i>	X	X	At5g49630	<i>AtAAP6</i>		X
At5g12380			X	At5g49890	<i>AtCLC-c</i>		X
At5g13580	<i>AtWBC6</i>		X	At5g50440	<i>AtMEMB12</i>	X	X
At5g14570	<i>AtNRT2.7</i>	X	X	At5g52450	<i>AtDTX16</i>		X
At5g14870	<i>AtCNGC18</i>	X	X	At5g53130	<i>AtCNGC1</i>	X	X
At5g15240			X	At5g53550	<i>AtYSL3</i>	X	X
At5g15410	<i>AtCNGC2/AtDND1</i>	X	X	At5g53760	<i>AtMLO11</i>	X	X
At5g16050	<i>AtGRF5/AtGF14-epsilon</i>		X	At5g55470	<i>AtNHX3</i>		X
At5g16150	<i>AtpGlcT</i>	X	X	At5g55630	<i>AtKCO1/AtTPK1</i>	X	X
At5g16830	<i>AtPEP12/AtSYP21</i>	X	X	At5g57090	<i>AtPIN2/AtAGR1</i>	X	X
At5g17850	<i>AtCAX8</i>	X	X	At5g57350	<i>AtAHA3</i>		X
At5g17860	<i>AtCAX7</i>	X	X	At5g57940	<i>AtCNGC5</i>	X	X
At5g18290	<i>AtSIP1.2</i>	X	X	At5g58060	<i>AtYKT61</i>		X
At5g18840			X	At5g58270	<i>AtATM3/AtSTA1</i>		X
At5g19280	<i>AtKAPP</i>	X	X	At5g59250		X	X
At5g19700	<i>AtDTX52</i>		X	At5g60770	<i>AtNRT2.4</i>	X	X
At5g23860	<i>AtTUB8</i>		X	At5g60780	<i>AtNRT2.3</i>		X
At5g23980	<i>AtFRO4</i>	X	X	At5g61520	<i>AtSTP3</i>	X	X
At5g24270	<i>AtCBL4/SOS3</i>		X	At5g62050	<i>AtOxa1a</i>		X
At5g24380	<i>AtYSL2</i>	X	X	At5g62690	<i>AtTUB2</i>		X
At5g26240	<i>AtCLC-d</i>		X	At5g62710		X	X
At5g26250	<i>AtSTP8</i>	X	X	At5g62920	<i>AtARR6</i>		X
At5g26340	<i>AtSTP13</i>	X	X	At5g63850	<i>AtAAP4</i>		X
At5g26980	<i>AtSYP41</i>	X	X	At5g64350	<i>AtFKBP12</i>		X
At5g27150	<i>AtNHX1/AtNHE1</i>	X	X	At5g65020	<i>AtAnn2</i>		X
At5g27360	<i>AtSFP2</i>		X	At5g65280	<i>AtGCL1</i>	X	X
At5g33280			X	At5g65970	<i>AtMLO10</i>	X	X
At5g35410	<i>AtSOS2/AtSnRK3.11</i>		X	At5g65990			X
At5g36940	<i>AtCAT3</i>	X	X	At5g67330	<i>AtNramp4</i>		X
At5g37780	<i>AtCaM1</i>		X				

Tabla 11: Cepas transformantes de levadura utilizadas en el ensayo SU a gran escala

Las cepas que se han creado para los ensayos SU individualizados se reflejan en la Tabla 12:

CEPA	GENOTIPO	PLÁSMIDO UTILIZADO PARA LA RECOMBINACIÓN	GEN CLONADO	REFERENCIA
PEP12N y NPEP12	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtPEP12</i>	En este trabajo
VAM3N y NVAM3	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtVAM3</i>	En este trabajo
VTI11N y NVTI11	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtVTI11</i>	En este trabajo
PIP1;1N y NPIP1;1	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtPIP1;1</i>	En este trabajo
PIP1;2N y NPIP1;2	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtPIP1;2</i>	En este trabajo
PIP2;1N y NPIP2;1	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtPIP2;1</i>	En este trabajo
PIP2;2N y NPIP2;2	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtPIP2;2</i>	En este trabajo
PIP2;3N y NPIP2;3	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtPIP2;3</i>	En este trabajo
PIP2;6N y NPIP2;6	THYAP5	JR2888 y JR2973	<i>AtPIP2;6</i>	En este trabajo
OST1N y NOST1	THYAP5	JR2742 y JR2743	<i>ScOST1</i>	En este trabajo
PEP12C	THYAP4	JR2746	<i>AtPEP12</i>	En este trabajo
VTI11C	THYAP4	JR2746	<i>AtVTI11</i>	En este trabajo
PIP1;1C	THYAP4	JR2746	<i>AtPIP1;1</i>	En este trabajo
PIP1;2C	THYAP4	JR2746	<i>AtPIP1;2</i>	En este trabajo
PIP2;1C	THYAP4	JR2746	<i>AtPIP2;1</i>	En este trabajo
PIP2;2C	THYAP4	JR2746	<i>AtPIP2;2</i>	En este trabajo
PIP2;6C	THYAP4	JR2746	<i>AtPIP2;6</i>	En este trabajo
PIP2;6C	THYAP4	JR2746	<i>AtPIP2;6</i>	En este trabajo
MetWBP1C	THYAP4	JR2746	<i>ScWBP1</i>	En este trabajo
TETWBP1C	THYAP4	JR2761	<i>ScWBP1</i>	En este trabajo

Tabla 12: Cepas de levadura utilizadas en los ensayos SU individualizados.

VI.2. MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS

Todos los microorganismos empleados y obtenidos a lo largo de este trabajo se mantienen a una temperatura de -70°C en los medios apropiados con una concentración de 25% de glicerol.

VI.2.1. *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a una temperatura de 37°C . Los cultivos líquidos se crecieron en agitación a una velocidad aproximada de 250 r.p.m.

Los medios utilizados y su composición son los que se detallan a continuación.

LB (Luria-Bertoni): Este es el medio que comúnmente hemos utilizado para el crecimiento de *E. coli*. Está compuesto por 0,5% extracto de levadura, 1% bactotripton y 1% NaCl.

Los medios sólidos, además, llevan en su composición agar al 1,5%.

Para estudiar la resistencia a antibióticos, los medios tanto sólidos como líquidos, se suplementaron, según las necesidades, con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml).

VI.2.2. *S. cerevisiae*

El cultivo de esta levadura se llevó a cabo a una temperatura de 28°C. Si el crecimiento se realizaba en medio líquido la agitación era de 200-250 r.p.m.

Los medios utilizados son los que se detallan a continuación:

YPD: Bactopectona 2%, extracto de levadura 1% y glucosa al 2%. Este medio fue utilizado como medio rico.

SD: Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acids 0,67%, glucosa 2%.

Los medios mínimos se suplementaron con los requerimientos necesarios para la selección y crecimiento de las cepas utilizadas.

SC: Bacto-yeast nitrogen base with amino acids 0,67%, glucosa 2%.

Cuando fue necesario los medios fueron suplementados con drogas específicas para seleccionar las cepas de interés.

Para el uso de medios sólidos se le añadió agar al 2%.

VI.3. VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS.

VI.3.1. Vectores

Los vectores utilizados para la construcción de los diferentes plásmidos empleados en este trabajo son los que se detallan a continuación.

- ***pBluescript SK⁺*** (Stratagene): plásmido autoreplicativo de 2,9 Kb funcional en bacteria, que contiene el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación *ColE1*, y un fragmento del operón *lac* de *E. coli*, que codifica para la enzima β-galactosidasa. Dispone de una secuencia de clonación múltiple, en la que hay 21 sitios de restricción, que permite la selección de clones recombinantes por α-complementación de cepas de *E. coli* portadoras de la delección *lacZM15*.
- ***pGEMT/pGEMTeasy*** (Promega): Son vectores de 3 Kb usados para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR en la que se utilizan ADNpolimerasas que añaden un desoxinucleótido de adenina a los extremos 5'.

Estos vectores presentan la particularidad de tener un desoxinucleótido de timina sobresaliente en el extremo de cada cadena, permitiendo la clonación de fragmentos que presenten un residuo de adenina en sus extremos 5'. Contienen el origen de replicación del fago *fl*, los promotores de la ARN polimerasa de los fagos T7 y SP6 flanqueando a una región de clonación múltiple en la secuencia codificante de la enzima β -galactosidasa.

- ***pSH47*** (Güldener *et al.*, 1996). Es un vector que lleva la secuencia que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor *GALI*. Utiliza como marcador de selección el gen *URA3*.
- ***pSH65*** (Güldener *et al.*, 2002). Es un vector que lleva la secuencia que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor *GALI*. Utiliza como marcador de selección la fleomicina.
- ***pUG6*** (Güldener *et al.*, 1996). Es un plásmido cuya principal característica es llevar el marcador de selección KanMX flanqueado por secuencias *loxP* las cuales son reconocidas específicamente por la recombinasa Cre.
- ***pLexAox5lacZ***: (Ruden *et al.*, 1991).

Los vectores utilizados para el ensayo de la SU fueron:

- **JR2761: *pTET-Cub***: (Este trabajo) El vector TET-Cub lleva la construcción promotora descrita por Garí *et al.*, (1997). Esta consta de un promotor híbrido (tet_p) formado por el promotor *tetO* y una secuencia que contiene la región TATA junto con la región leader del gen *CYCI* de *S. cerevisiae*. Esta región promotora será activada por el transactivador tTA regulable por tetraciclina y sus derivados. Para construir este vector se partió del plásmido PCM189 (Gari *et al.*, 1997), el cual fue digerido con enzimas específicas (*EcoRI* y *HindIII*) obteniendo la secuencia *tTA-CMV_p-ADHt-tet_p-MCS-CYCI*t. Esta secuencia se clonó en el plásmido centromérico YCplac111 cortado con *EcoRI* y *HindIII*. Por último se amplificó con los oligonucleótidos específicos (oliCYC-PLV y oliTETp-B1) la secuencia *B1-KanMX-B2CubPLV* del plásmido Hxt7XCub. Esta amplificación lleva extremos recombinogénicos homólogos al promotor *Tet* y al terminador *CYCI*. Se realizó una transformación de levadura con el plásmido YCplac111-tTA-CMV_p-ADHt-tet_p-MCS-CYCI t linearizado con la endonucleasa de restricción *HindIII* junto a la amplificación *B1-KanMX-B2CubPLV*, resultando por recombinación homóloga el vector pTET-Cub.

- **JR2746: *pMetYCgate*** (Obrdlik *et al.*, 2004, en este trabajo) Este vector lleva el promotor del gen que codifica a la *O*-acetyl homoserina sulfhidrolasa (homoserina sintetasa) *Met25*. Este promotor se reprime por metionina. En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el módulo *B1-KanMX-B2* (oliB1, oliB2), el molde utilizado fue el plásmido Hxt7XCub. Paralelamente se amplificó el promotor *Met25* del plásmido pGFP-C-FUS (Niedenthal *et al.*, 1996) utilizando los oligonucleótidos, oliHxtMet25 y oliB1Met25, que anillan específicamente en el promotor *Met25* y además llevan secuencias homólogas al plásmido Hxt7XCub en el lugar que precede al promotor *HXT7* y a la secuencia B1. Con los dos fragmentos obtenidos de ambas PCRs, *B1-KanMX-B2* y *preHxtp-Met25-B1* y el plásmido Hxt7XCub digerido con la enzima de restricción *Asp718* se transformó levadura seleccionándose en un medio suplementado con geneticina. Se obtuvo por recombinación homóloga *in vivo* el vector pMetYCgate.
 - **JR 2742: *pXNgate 21*** (Obrdlik *et al.*, 2004, en este trabajo).
 - **JR 2743: *pNXgate 32*** (Obrdlik *et al.*, 2004, en este trabajo).
- Para la construcción de los vectores que llevan el extremo amino de la ubiquitina, pXNgate y pNXgate, se utilizaron como punto de partida los plásmidos episómicos descritos por Stagljär (1998) el pNubGALG5 y el pOST1-NubG.
- Para la construcción del vector **pNXgate**, se digirió el plásmido pNubG-ALG5 con la endonucleasas de restricción *PstI*. El extremo cohesivo que genera la actuación de dicha enzima de restricción fue sometido a la acción exonucleasa de la encima Klenow, obteniéndose así un nuevo extremo romo. Posteriormente se digirió con una segunda enzima de restricción *SallI*. Además se amplificó el módulo KanMX del plásmido PUG6. Los oligonucleótidos (oliB2Te, oliSalIB1PUG6) empleados en esta reacción de PCR añadieron a esta secuencia un sitio de corte *SallI*-B1 por un extremo y la secuencia B2 por otro, obteniendo así una secuencia *SallI*-B1-KanMX-B2. Esta amplificación se ligó al plásmido linearizado pNubG-ALG5 obteniéndose así el vector pNXgate.
 - Para la construcción del plásmido **pXNgate** se hizo una primera amplificación del casete KanMX utilizando como molde el vector PUG6. Los oligonucleótidos (oliNdeIB1PUG6 y oliPUG6B2) usados en la reacción de PCR añadían a la secuencia amplificada un sitio reconocido por la endonucleasa de

restricción *NdeI* seguida de la secuencia B1 por un lado y la secuencia B2 en el otro extremo obteniendo así un fragmento *NdeI-B1-KanMX-B2*. Se realizó posteriormente una segunda amplificación en la cual se amplificó la secuencia NubG del plásmido pOST1NubG; los oligonucleótidos (oliB2NubG y oliNubPstI) empleados añadían al fragmento NubG la secuencia B2 por un lado y la secuencia reconocida por la endonucleasa de restricción *PstI* por el otro, obteniéndose así la amplificación *B2-NubG-PstI*. Estas dos secuencias amplificadas fueron digeridas específicamente; la secuencia *NdeI-B1-KanMX-B2* fue digerida con las enzimas de restricción *BamHI/NdeI* y la secuencia *B2-NubG-PstI* con las enzimas *BamHI/PstI*. Las secuencias digeridas fueron ligadas junto al vector pOST1NubG cortado por con las enzimas *NdeI/PstI* obteniéndose así el plásmido pXNgate.

Todos los plásmidos obtenidos fueron comprobados por secuenciación utilizando oligonucleótidos específicos.

- **JR 2973:pNXgate33-3HA** (Obrdlik *et al.*, 2004)
- **JR 2888:pXNgate21-3HA** (Obrdlik *et al.*, 2004)
- **JR 2887: pNubWT-2** (Obrdlik *et al.*, 2004).

VI.3.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados se agrupan en la siguiente tabla.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
olilexHIS1	5'-TAATGAATTATACATTATATAAAGTAATGTGATTCTTCGAAGAATTCGTAC GCTGCAGGTCGAC-3'
olilexHIS4	5'-GGTTTCATTTGFAATACGCTTTACTAGGGCTTTCTGCTCTGTCATTATAGTTTT TTCCTTGACGT-3'
oliFUS2	5'-AACTTCTTTGCGTCCATCCAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'
oliFUS3	5'-CAGATCCAATAAGTGGCTATGCTTGGATGGACGCAAGAAGTT-3'
oliHIS3a	5'-ATCTCCTTTAGCTTCTCGAC-3'
oliHIS3b	5'-GATCGCAATCTGAATCTTGG-3'
olilexADE1	5'-ATCATCTCATTTCGTAATAACCAATGTATTATATATTGAAAGCTTCGTACG CTGCAGGTCGAC-3'
olilexADE4	5'-TCCCAATTGTCCTCCTAATATACCAACTGTTCTAGAATCCATTATAGTTTT TTCCTTGACGT-3'
oliADE2a	5'-CCAATGTGTCCATCTGACAT-3'
oliADE2b	5'-GCTGCCTCAACAATCATAACG-3'
oliTRP1lac1	5'-GTTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTGTAAGCATATAAAAAATAGTTAATT CGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
oliTRP1lac2	5'-TTAGTTTTGTGGCCGCATCTTCTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'

(Continuación Tabla 13)

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
oliTRP1lac3	5'-CAGATCCAAGTGGCTATGCAGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAA-3'
oliTRP1lac4	5'-CAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTATT ATTTTGGACACCAGACCAACT-3'
oliTRP1a	5'-CATTGGTGAATAATTGAGCAC-3'
oliTRP1b	5'-GCAGGCAAGTGCACAAACAA-3'
oliS2-ADE2	5'-CTTGTTTTCTAGATAAGCTTCGTAACCGACAGTTTCTAACTTTGGCATAGGCCAC TAGTGGATCTG-3'
oliA1-ADE2	5'-GACTAGTAACGCCGTATCGTG-3'
oliA4-ADE1	5'-GTATGAAGTCCACATTTGATG-3'
oliSallB1PUG6	5'-GGGTCGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCAACCATGAATTCTATAC GAAGTTATTAGGTC-3'
oliNdeIB1PUG6	5'-TCATATGTGAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCAACCATGAATTCT ATACGAAGTTATTAGGTC-3'
oliPUG6B2	5'-CACCGGATCCGCCACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCCGGGAGCT CGTTTTCGACACTGG-3'
oliB2NubG	5'-TGGTGGCGGATCCGGTGGAGGTGGATCAATGCAGATTTTCGTCAGACTT-3'
oliNubPst1	5'-CTGCAGCGTAATCTGGAAACGTCATATGGATAGGATCCTGCAAGTCCGGGACGTC TACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAAACCAAGGATTCCTTCCTTG-3'
oliCYC-PLV	5'-GGGAGGGCGTGAAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGATGCGGCCCTCCTACC CACCGTACTCGTCAA-3'
oliTETpB1	5'-CTATAGACACGCAAAACACAAATACACACACTAAATTACCGGATCAATTTCGACA AGTTTGTACAAAAAAGC-3'
oliHxtMet25	5'-GGAATTAACCCCTCACTAAAGGGAAACAAAAGCTGGGTACCGGATGCAAGGGTTCGA ATCCC-3'
oliB1Met25	5'-CATGGTGGTTGGAGAGCCTGCTTTTTTGTACAAAATTGTTGATGGATGGGGTAAAT AGA-3'
oliB1-OST1	5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCAACCATGAGGCAAGTTGGTTCTC-3'
oliB2-OST1	5'-TCCGCCACCAACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTTAGTTACGTTTATGT TCA-3'
oliB2-WBP1	5'-TCCGCCACCAACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTTGTTTTTTTGAATG TTTC-3'
oliB1-WBP1	5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCAACCATGCGGACCGATTGGAATT TTTTTC-3'
oliB1	5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCAACCATG-3'
oliB2	5'-TCCGCCACCAACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAG-3'
olikanB	5'-CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT-3'
olikanB1	5'-TGTACGGGCGACAGTCACAT-3'
olikanC	5'-TGATTTTGTGACGAGCGTAAT-3'
olikanC2	5'-CCTCGACATCATCTGCCAGAT-3'
oliTRP1a1	5'-ATTACGAAACAGCCAACCA-3'
oliHIS5a	5'-GATACAGTTCTCACAACA-3'

Tabla 13: Oligonucleótidos empleados

Además fueron necesarios los oligonucleótidos diseñados por Dr. Robert Herzog y colaboradores (Université libre de Bruxelles) que amplifican las secuencias de los ORF de *A. thaliana* utilizados en este trabajo.

Este grupo fue el encargado de la elaboración de un programa informático que permite el rápido diseño de un gran número de oligonucleótidos específicos basándose en la energía libre

de las parejas de estos cebadores. Los oligonucleótidos tienen todos una estructura común que consta de las secuencias recombinogénicas B1 y B2, y de la secuencia específicas de entre 19 y 25 pb que anilla en el inicio y el final del ORF que se quiere amplificar (Figura 32).



Figura 32. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los ORF empleados en el estudio a gran escala.

La adición de las secuencias recombinogénicas B1 y B2 a las amplificaciones de los ORF permite que se dé recombinación homóloga con las secuencias B1 y B2 de los vectores empleados en el sistema SU. La recombinación homóloga se realiza en levadura construyéndose en un solo paso las cepas y los plásmidos adecuados para el sistema SU.

VI.4. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

VI.4.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.

Se utilizó el kit comercial específico para la obtención del ADN plasmídico Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems de Promega.

VI.4.2. Obtención de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*.

Para la obtención del ADN plasmídico se partió de 1 ml de cultivo de levadura saturado. Se recogieron por centrifugación las células y se resuspendieron en 200µl de tampón A (100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 %SDS). Se añadieron bolitas de vidrio y se agitó por vortex para conseguir la lisis celular. Se añadió 300 µl de fenol y se agitó vigorosamente hasta conseguir una mezcla homogénea. Se centrifugó y se recogió la fase acuosa. Se realizó una segunda extracción con fenol cloroformo 1:1. Se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ADN añadiendo a la fase acuosa dos volúmenes de etanol 100%, 1:20 de NaAcO pH 7 y poniendo la mezcla a -20°C durante 15 minutos. Se centrifugó y se desechó

el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol al 80%. Se resuspendió en 50µl de agua destilada.

Para la recuperación del plásmido se transformaron células bacterianas competentes DH10 de *E. coli*.

VI.4.3. Obtención de ADN genómico de *S. cerevisiae*.

Se siguió el protocolo descrito en manual Molecular Cloning de Sambrook y Russell (2001).

VI.5. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

VI.5.1. Transformación de células de *E. coli*

La preparación de las células competentes y el proceso de transformación se realizaron siguiendo los procedimientos estándar (Sambrook, Russell., 2001).

Para la preparación de células electrocompetentes se empleó la cepa DH10. Se inoculó un litro de medio LB con 10 ml de un preinóculo saturado. El cultivo se creció en agitación a una temperatura de 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Se enfrió durante 15 minutos en un baño de agua-hielo y se pasó a botes de centrifugación GSA previamente enfriados. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 r.p.m. durante 1 minuto a 4°C. El precipitado se resuspendió en un litro de glicerol al 15% frío, se recogieron nuevamente las células por centrifugación y se lavaron 2 veces más con 15% de glicerol, un primer lavado con 500 ml y un segundo lavado con 200 ml. Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de GYT (15% glicerol, 0,125% extracto de levadura y 0,25% triptona), se repartieron en alícuotas de 100µl y se congelaron, almacenándose a -80°C hasta su utilización.

La transformación de células electrocompetentes se realizó previa descongelación de las células en hielo, mezclando 40 µl de células con el ADN transformante (10 pg-25 ng). La mezcla de transformación se pasó a cubetas de electroporación de 0,2 cm³ (Bio-Rad), previamente enfriadas en hielo, y se sometió a un pulso (2500 V, 200 W, 25 mF) en el electroporador Gene-Pulser (Bio-Rad). Tras el pulso se le añadió a cada cubeta 1 ml de medio LB frío, se resuspendieron las células y se pasaron rápidamente a los distintos eppendorf. Estos se pusieron a incubar a 37°C durante 50-60 minutos.

La mezcla de transformación se recogió por centrifugación y se sembró en el medio sólido de selección.

VI.5.1. Transformación de células de *S. cerevisiae*.

Se siguió el protocolo descrito por Gietz (2002).

VI.6. MANIPULACIÓN DEL ADN.

VI.6.1. Digestion enzimática.

Las diferentes endonucleasas de restricción empleadas en este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales Roche Applied Science, Fermentas, Pharmacia, Promega o New England Biolabs y empleadas de acuerdo con las especificaciones dadas por los proveedores.

VI.6.2. Ligación de fragmentos de ADN.

La ligación entre moléculas de ADN con extremos compatibles se realizó mediante el empleo de la enzima T4ADNligasa (Fermentas). En el caso de las ligaciones de fragmentos de ADN procedentes de reacciones de PCR se utilizó la enzima T4ADNligasa (Promega). En ambos casos las moléculas de interés se seleccionaron por transformación de células competentes de *E. coli* con la mezcla de ligación.

VI.6.3. Electroforesis de ADN.

La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa (Roche) de diferentes concentraciones. El porcentaje de agarosa osciló entre 0,8-2% (p/v), dependiendo del tamaño de las muestras a resolver. Estos geles llevan Bromuro de etidio (0,5 µg/ml). La electroforesis se desarrolló a voltaje constante (100 V) en tampón TBE (90 mM Tris-HCL, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA).

Las bandas se observaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un sistema de fotografía digital (Gel Doc 2000 Bio-Rad).

VI.6.4. Purificación de un fragmento de ADN en el gel de agarosa o en solución.

Se cortó con un bisturí la banda a extraer de un gel de agarosa. Para la extracción del fragmento de ADN del gel de agarosa se utilizó el kit comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences).

VI.6.5. Amplificación de fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las amplificaciones de ADN se realizaron empleando diferentes polimerasas dependiendo de las necesidades de cada reacción.

Para la amplificación fidedigna de fragmentos se emplearon las siguientes ADN polimerasas Expand High Fidelity PCR System (Roche) y Triplmaster PCR System (Eppendorf). Las PCRs analíticas se realizaron con la enzima Biotools ADN Polymerase (Biotools, B&M.Labs. S.A. Madrid. España). En todos los casos las reacciones se prepararon de acuerdo a las especificaciones dadas por los proveedores de las ADN polimerasas.

El proceso de amplificación incluía una etapa de desnaturalización (5 minutos a 95°C), la etapa de amplificación (30 ciclos) y por último una etapa de extensión (1 ciclo 10 minutos). La etapa de amplificación consta a su vez de 3 pasos: un primer paso de desnaturalización (un minuto a 94°C), un segundo paso de anillamiento (un minuto) y un tercer paso de extensión. La temperatura de anillamiento fue variable dependiendo de la temperatura media de fusión (T_m) y de los oligonucleótidos empleados. La T_m osciló entre los 48-60°C. La temperatura de extensión es determinada por las especificaciones de las polimerasas utilizadas (68°C o 72°C) y el tiempo de este paso dependía del tamaño del fragmento que se pretende amplificar (aproximadamente 1 min/Kb).

La amplificación de los genes de *A. thaliana* para su uso en el ensayo de la SU a gran escala (Genexpress) tuvo las siguientes características:

- El molde utilizado para la amplificación de los genes fue ADNc obtenido a partir de ARN de *A. thaliana* de la variedad Col0.
- El tiempo de extensión fue variable debido a la diversidad de tamaños que presentan los ORF (entre 350 a 4500 pb) dividiéndose el proceso de amplificación en 4 subgrupos que diferían en el tiempo de extensión dependiendo de la longitud de los genes amplificados. El proceso de amplificación se llevó a cabo con

diferentes polimerasas comerciales probando diferentes búferes y reactivos en el proceso.

- Los oligonucleótidos específicos fueron los descritos en el apartado VI.3 de materiales y métodos.

Tras realizar el proceso de amplificación cada una de las muestras fueron cargadas en geles de agarosa para comprobar su correcto tamaño y estimar su concentración.

VI.6.6. Secuenciación de ADN.

Todas las muestras fueron secuenciadas en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Laboratorio 314, Edificio Departamental. Salamanca. España. e-mail: serv.sadn@usal.es), empleando una variante del método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystem) y el kit “ABI PRISM” BigDye™ Primer v.30 Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaq ADN Polymerase, FS” (Applied Biosystems).

VI.7. MANIPULACIÓN DEL ARN.

VI.7.2. Síntesis de ADN copia (ADNc).

El ADN copia (ADNc) fue sintetizado a partir de una solución de ARN, libre de ADN, en una reacción de transcripción reversa empleando el cebador oligo-dT (18 mer) (Isogen) y la enzima SuperScrip™ II RT (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

VI.8. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.

VI.8.1. Obtención de extractos proteicos de *S. cerevisiae*.

Para la obtención de extractos proteicos el protocolo seguido fue una variación del descrito por Pasch *et al.*, 2005.

Los cultivos fueron cultivados en medio líquido hasta una DO₆₀₀ de 0,8-1,2. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y posteriormente con 1 ml de 50 mM Tris-HCL pH 7,5. Se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 500 ml de solución de lisis fría (50 mM Tris-HCL pH 7,5, “Complete Mini EDTA-free” de inhibidores de proteasas de Roche

Applied Science, 1 mM PMSF). La lisis celular se realizó de una manera mecánica, utilizando bolitas de vidrio (Glass beads 425-600 μm (Sigma)) y agitación por vortex a la máxima potencia. Se realizaron 7 ciclos de 30 segundos separados por un minuto de descanso en el que la mezcla se mantenía en hielo.

Se empleó como método alternativo para la lisis celular la Fast Prep realizando dos ciclos de 11 segundos cada uno a una potencia de 5.

Tras la lisis celular se precipitaron las bolitas de vidrio por centrifugación. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 2000 r.p.m. durante 20 minutos. Se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo y este se denominó extracto crudo.

En los experimentos en que se necesitó ver la liberación del factor PLV, se centrifugó el extracto crudo a una velocidad de 56000 r.p.m. durante 2 horas y a una temperatura de 4°C. La ultracentrífuga utilizada fue Optima™ Ultracentrifuge de Beckman y el rotor utilizado fue el TLA-100.2 de Beckman con tubos de un mililitro de Beckman.

Tras la centrifugación de 2 horas se recogió el sobrenadante que fue nuestra fase citosólica. El pellet fue resuspendido en la solución de lisis fría con triton al 0,5%. Se ultracentrifugó por segunda vez a 56000 r.p.m. durante 2 horas. El sobrenadante obtenido sería la fase de membrana.

Para analizar la concentración proteica se empleó el método Bradford.

VI.8.2. Precipitación de las proteínas de *S. cerevisiae*.

La precipitación proteica se realizó con tricloroacético (TCA) o en ocasiones se siguió el protocolo descrito por Wessel y Flügge en 1984.

VI.8.3. Separación electroforética de proteínas.

Para la separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS se siguió el método descrito por Laemmli (1970), utilizando el sistema Miniprotein II (Bio-rad). La composición del gel de separación contenía la mezcla de acrilamida-bisacrilamida (acrilamida 30: bisacrilamida 0,8) en una concentración variable dependiendo del tamaño de las proteínas de interés, 0,375 mM Tris pH 8,8 y 0,1% SDS. La polimerización se realizaba añadiendo a la mezcla desgasificada 0,005% TEMED, y 0,05% de persulfato amónico.

El gel de empaquetamiento contenía 1,5% de la solución acrilamida-bisacrilamida, 120 mM Tris-HCL pH 6,8 y 1% SDS. La polimerización se realizó con los mismos compuestos

que en el caso del gel de separación. Previamente a cargar las muestras, estas se desnaturalizaron en presencia de tampón de carga (50 mM Tris-HCL pH6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol) a 100°C durante 5 min. Los geles se resolvieron en tampón Tris-glicina (25 mM Tris-HCL, 150 mM glicina, 0,1% SDS). Se aplicó una fuente continua de 30 mA por gel. Como marcadores de tamaño de proteínas se empleó la mezcla comercial de marcadores preteñidos “Prestained SDS-PAGE Standards” (Bio-Rad) con un peso molecular comprendido entre 19-117 kDa.

VI.8.4. Detección de proteínas con epítopos inmunoreactivos.

Las muestras proteicas resueltas en el gel fueron transferidas a una membrana de polivinilideno (PVDF: Inmobilon-P, Millipore) empleando el sistema “Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) y el tampón de transferencia utilizado fue el CAPS (20% metanol, 10% NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃).

Una vez finalizada la transferencia se comprueba que ha ido correctamente tiñendo la membrana con una solución de Rojo Ponceau (Sigma). Para quitar este colorante se realizaron sucesivos lavados con PBS-Tween (2,5g/l Tris base, 9g/l NaCl, 0,1% Tween20).

La membrana limpia se bloqueaba durante al menos una hora en una mezcla de leche desnatada en polvo (Molico) al 5% en tampón PBS-Tween.

Tras el proceso de bloqueo la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante aproximadamente una hora. Pasado este tiempo de incubación se lavó la membrana con PBS-Tween. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario disuelto en la solución de bloqueo y se volvió a incubar una hora. Al transcurrir el tiempo de incubación se desechó la dilución de anticuerpo secundario y se lavó con PBS-Tween.

Para la inmunodetección se utilizó el kit “ImmobilonTM Western Chemiluminiscent HRP Substrate” (Millipore). Se reveló la membrana en películas de autorradiografía HiperfilmTM-MP (Amersham).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- Anti-HA monoclonal (Babco).
- VP16 anticuerpo policlonal obtenido en conejo y que reconoce los aminoácidos desde 462-479 de VP16 (BD Biosciencias).
- VP16 (1-21) es una anticuerpo monoclonal obtenido en ratón que reconoce los aminoácidos desde 456-490 de VP16 (Santa Cruz Biotechnology).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron:

- Anti-IgG-HRP de ratón (Amersham).
- Anti-IgG-HRP de conejo (Amersham).

VI.9. ENSAYO DE LA SU

VI.9.1. Ensayo de crecimiento.

Se cultivó una de las cepas cebo que portaban el extremo carboxilo de la ubiquitina (Cub) en 15 ml de medio líquido SC sin leucina durante un día.

Paralelamente, se replicó a medio líquido SC (150 μ l) sin triptófano cada una de las 5 placas multipocillo tipo deepwell de 96 que contienen las cepas que expresan las cepas presa Nub dejándolas crecer hasta saturación. Para llevar a cabo la réplica se utilizó el replicador “96 Pin Replicator, Stainless Steel Pins” (Nunc).

Estas placas multipocillo se replicaron a medio sólido YPD utilizando el replicador junto con el “Omnitray Copier” (Nunc) que permite depositar cada una de las cepas replicadas en una posición específica facilitando con ello la superposición de cepas de cultivos líquidos. Estas placas de YPD sólido se cultivaron durante 12 horas a 28°C.

Después, utilizando el “Omnitray Copier” y el replicador de 96, se depositó sobre cada una de las colonias Nub crecidas en YPD sólido la cepa Cub cebo, propiciando la formación de diploides.

Tras 24 horas a 28°C se picó cada una de las colonias con el replicador y la ayuda del “Omnitray Copier” y se depositó cada una de las cepas diploides en un pocillo de las placas multipocillo rellenas con 150 μ l de agua. Este paso permite la dilución de las cepas y del medio YPD que pueda arrastrarse en la réplica.

Cada una de las cepas se pasó a nuevas placas con medio SC sin leucina y triptófano que permite seleccionar las cepas diploides Cub-Nub.

Al cabo de dos días a 28°C se midió el crecimiento de los diploides analizando la DO_{595} .

Por último, cada cepa diploide se replicó a los medios selectivos utilizados en el ensayo SU (SD y SD suplementado con 250 μ M de metionina). Estos medios permiten analizar la expresión de los genes reporteros *ADE2* e *HIS3*. Se dejó crecer en los medios de selección durante 5 días midiendo DO_{595} a los 3, 4 y 5 días.

Este método aparece esquematizado en la figura 33:

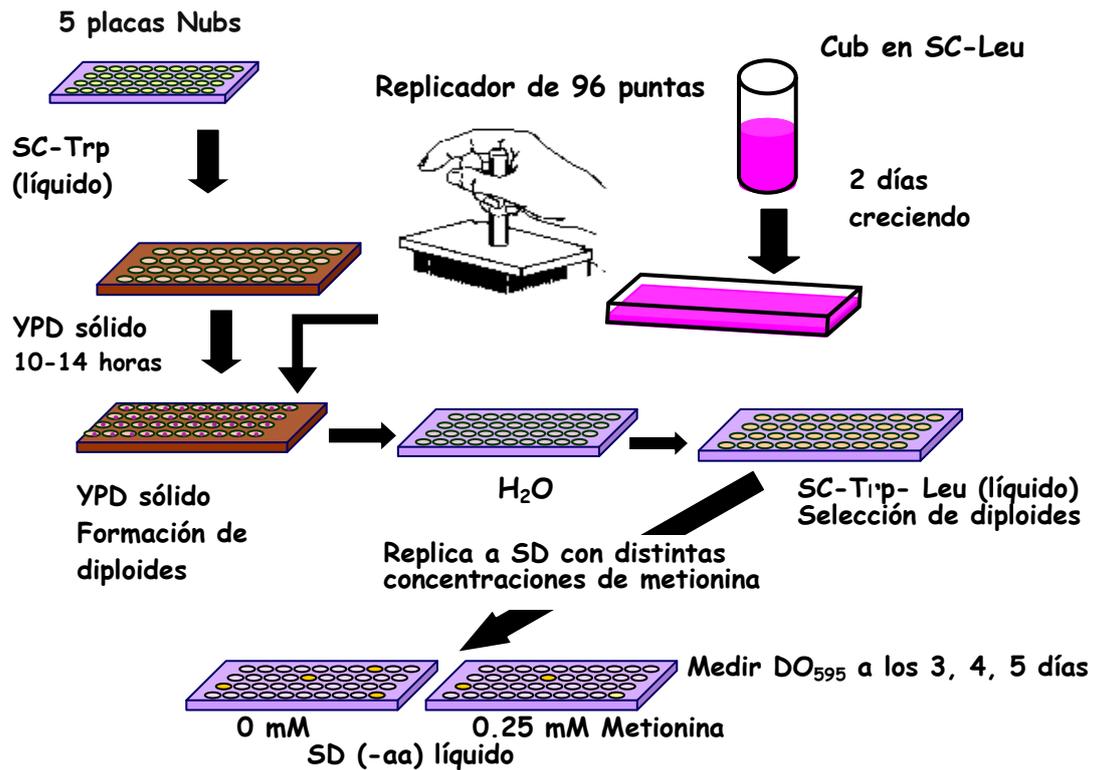


Figura 33: Experimento de la SU adaptado a gran escala.

VI.9.2. Análisis de la actividad β -galactosidasa.

Para comprobar la interacción entre proteínas por el método SU, además de los ensayos de crecimiento, que analizan la expresión de los genes *ADE2* e *HIS3* también se analizó la expresión del gen *LacZ*. Este tipo de análisis mostró más especificidad aunque menos sensibilidad que los métodos de crecimiento en medio líquido.

Para este ensayo se cultivaron en medio sólido selectivo los diploides Cub-Nub.

Se disolvió agarosa al 0,5% en buffer fosfato sódico pH 7,2 al 0,5 M. Se dejó enfriar hasta llegar a 50 °C y se le añadió una solución de X-gal disuelto en dimetil formamida (2% de dimetil formamida y 2 mg/ml de X-gal) y SDS hasta una concentración final del 0,2%. Esta solución, tras agitarse, se vertió sobre la placa de medio sólido en la cual habían crecido las cepas diploides.

Se dejó a temperatura ambiente hasta que polimerizó completamente la solución de agarosa y posteriormente se incubó a una temperatura de 37°C.

Los resultados se analizaban a distintos tiempos no superando las 12 horas.

VI.9.3. Proceso de estandarización.

El proceso de estandarización de datos utilizado en los ensayos “ómicos” es el que viene determinado por la obtención del Z-score.

En este trabajo para obtener el Z-score de los resultados obtenidos en el ensayo a gran escala, se utilizaron parámetros robustos de la tendencia central como son la mediana y el espacio intercuartílico (IQR), haciendo que la distribución este menos afectada por valores extremos (valores que representan crecimiento).

La fórmula aplicada fue:

$$Z\text{-score} = \frac{\text{Log}_2\text{DO}_{595} - \text{Mediana (distribución)}}{\frac{\text{IQR (distribución)}}{1,34}}$$

1,34 es un factor de corrección que viene definido por el valor del espacio intercuartílico de una distribución estándar con una desviación típica de 1.

Utilizando estos parámetros se procedió al proceso de estandarización utilizando tres tamaños de distribución distintos: el primero de ellos, a nivel de placa, que compara los resultados dentro de una misma placa; el segundo, a nivel de cepa Cub, que permite el contraste de todos los valores que se obtienen de una misma cepa Cub con los correspondientes Nub y por último todos los resultados obtenidos con cada cepa Nub. Este tratamiento de datos hace que los valores más altos de Z-score correspondan a aquellos diploides que muestran una mayor DO_{595} que los de la placa a la que pertenecen, mayor que el resto de los diploides en los que están implicados esos clones Cub y mayor que la de los diploides en los que están implicados los correspondientes clones Nub.

En este trabajo se ha elegido un nivel de significación de 0,01 y se ha aplicado la corrección de Bonferroni haciendo más estricta la selección de los datos estadísticamente positivos.

VI.10. SOPORTE INFORMÁTICO

El análisis de las secuencias de ADN se llevó a cabo con varios programas: Ediseq, MapDraw, Megaling y SeqMan, suministradas por DNASTAR (DNASTAR In, Madison, WI).

La búsqueda de homología de secuencias se realizó mediante los programas FASTA y BLAST.

Las imágenes de geles de agarosa con muestras de ADN se tomaron con el equipo de fotografía electrónica Gel Doc2000 (Bio Rad).

El análisis de imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop y con el programa Microsoft PowerPoint con sus distintas actualizaciones.

Para el estudio de los ORF las bases de datos utilizadas fueron GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y ARAMENNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>)(Schwacke *et al.*, 2003).

Para el análisis de las interacciones proteicas las bases de datos utilizadas fueron: AtPID (Cui *et al.*, 2008.), *Arabidopsis* Interactions Viewer (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/Arabidopsis_interactions_viewer.cgi) (Geisler-Lee *et al.*, 2007), De Bodt *et al.*, 2009 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/supplementary_data/stbod/athPPI/site.php), BioGRID (<http://www.thebiogrid.org/>) (Stark *et al.*, 2006), IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact>) (Kerrien *et al.*, 2007) y STRING 8 (<http://string.embl.de/>)(Von Mering *et al.*, 2005, 2007; Jensen *et al.*, 2009).

Para el análisis, visualización y representación de las interacciones proteicas se utilizó el programa Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>) (Smooth *et al.*, 2011).

Para las representaciones gráficas, para agrupar los resultados y aplicar las fórmulas bioestadísticas se utilizó el programa Microsoft Excel con sus distintas actualizaciones.

Para analizar la concentración proteica transferida a membrana y la intensidad de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blot el programa usado fue el Quantity one 4.6.6 Bio Rad.

VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams P., Zhang R., Poustovoitov M., SeeHolzer S., Ohh M. **Identification of Associated Protein By Coimmunoprecipitation.** Protein-Protein Interactions A molecular cloning manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition. *Cold Spring Harbor, New York*. 2005.
2. Alaedini A., Day R. A. **Identification of two penicillin-binding multienzyme complexes in *Haemophilus influenzae*.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Oct 14;264(1):191-5.
3. Alexandersson E., Fraysse L., Sjövall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., Karlsson M., Johanson U., Kjellbom P. **Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins.** *Plant Mol Biol.* 2005 Oct;59(3):469-84.
4. Ali R., Brett C. L., Mukherjee S., Rao R. **Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast.** *J Biol Chem.* 2004 Feb 6;279(6):4498-506.
5. Ali R., Zielinski R. E., Berkowitz G. A. **Expression of plant cyclic nucleotide-gated cation channels in yeast.** *J Exp Bot.* 2006;57(1):125-38.
6. Ali W., Isayenkov S.V., Zhao F. J., Maathuis F. J. **Arsenite transport in plants.** *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jul;66(14):2329-39.
7. Aloy P., Ceulemans H., Stark A., Russell R. B. **The relationship between sequence and interaction divergence in proteins.** *J Mol Biol.* 2003 Oct 3;332(5):989-98.
8. An R., Chen Q. J., Chai M. F., Lu P. L., Su Z., Qin Z. X., Chen J., Wang X. C. **AtNHX8, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li/H antiporter.** *Plant J.* 2007 Feb;49(4):718-28.
9. Arifuzzaman M., Maeda M., Itoh A., Nishikata K., Takita C., Saito R., Ara T., Nakahigashi K., Huang H. C., Hirai A., Tsuzuki K., Nakamura S., Altaf-Ul-Amin M., Oshima T., Baba T., Yamamoto N., Kawamura T., Ioka-Nakamichi T., Kitagawa M., Tomita M., Kanaya S., Wada C., Mori H. **Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12.** *Genome Res.* 2006 May;16(5):686-91.
10. Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M., Sherlock G. **Gene Ontology: tool for the unification of biology.** *Nature Genetics* 2000 25, 25-29.
11. Babu M., Krogan N. J., Awrey D. E., Emili A., Greenblatt J. F. **Systematic Characterization of the Protein Interaction Network and Protein Complexes in *Saccharomyces cerevisiae* Using Tandem Affinity Purification and Mass Spectrometry.** *Methods Mol Biol.* 2009;548:187-207.
12. Barrios-Rodiles M., Brown K. R., Ozdamar B., Bose R., Liu Z., Donovan R. S., Shinjo F., Liu Y., Dembowy J., Taylor I. W., Luga V., Przulj N., Robinson M., Suzuki H.,

Hayashizaki Y., Jurisica I., Wrana J. L. **High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells.** *Science*. 2005 Mar 11;307(5715):1621-5.

13. Benga G. **Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future.** *UBMB Life*. 2009 Feb;61(2):112-33.

14. Berggård T., Linse S., James P. **Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions.** *Proteomics*. 2007 Aug;7(16):2833-42.

15. Bertl A., Kaldenhoff R. **Function of a separate NH₃-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat.** *FEBS Lett*. 2007 Nov 27;581(28):5413-7.

16. Bienert G. P., Thorsen M., Schüssler M. D., Nilsson H. R., Wagner A., Tamás M. J., Jahn T. P. **A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes.** *BMC Biol*. 2008 Jun 10;6:26.

17. Bishopp A., Benková E., Helariutta Y. **Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots.** *Curr Opin Plant Biol*. 2011 Feb;14(1):10-6.

18. Blakeslee J. J., Bandyopadhyay A., Lee O. R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S. N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J., Geisler M., Nagashima A., Sakai T., Martinoia E., Friml J., Peer W. A., Murphy A. S. **Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*. 2007 Jan;19(1):131-47.

19. Borsics T., Webb D., Andeme-Ondzighi C., Staehelin L. A., Christopher D. A. **The cyclic nucleotide-gated calmodulin-binding channel AtCNGC10 localizes to the plasma membrane and influences numerous growth responses and starch accumulation in *Arabidopsis thaliana*.** *Planta* 2006 Vol.225, Number 3, 563-573.

20. Boruc J., Van den Daele H., Hollunder J., Rombauts S., Mylle E., Hilson P., Inzé D., De Veylder L., Russinova E. **Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network.** *Plant Cell*. 2010 Apr;22(4):1264-80.

21. Braun T., Philippsen A., Wirtz S., Borgnia M. J., Agre P., Kühlbrandt W., Engel A, Stahlberg H. **A projection map of the glycerol facilitator GlpF: a variant of the aquaporin tetramer.** *EMBO Rep*. 2000 Aug;1(2):183-9.

22. Brymora A., Valova V. A., Robinson P. J. **Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry.** *Curr Protoc Cell Biol*. 2004 May;Chapter 17:Unit 17.5.

23. Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C., Frommer W. B. **Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*.** *Plant J*. 2003 Apr;34(1):13-26.

24. Butland G., Peregrín-Alvarez J. M., Li J., Yang W., Yang X., Canadien V., Starostine A., Richards D., Beattie B., Krogan N., Davey M., Parkinson J., Greenblatt J., Emili A. **Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*.** *Nature*. 2005 Feb 3;433(7025):531-7.

25. Camoni L., Harper J. F., Palmgren M. G. **14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK).** *FEBS Lett.* 1998 Jul 3;430(3):381-4.
26. Cervantes S., González-Duarte R., Marfany G. **Homodimerization of presenilin N-terminal fragments is affected by mutations linked to Alzheimer's disease.** *FEBS Lett.* 505 1 2001, pp. 81–86.
27. Chang I. F., Curran A., Woolsey R., Quilici D., Cushman J. C., Mittler R., Harmon A., Harper J.F. **Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*.** *Proteomics.* 2009 Jun;9(11):2967-85.
28. Chen H., Skolnick J. **M-TASSER: an algorithm for protein quaternary structure prediction.** *Biophys J.* 2008 Feb 1;94(3):918-28.
29. Chen J., Lalonde S., Obrdlik P., Vatani A. N., Parsa S. A., Vilariño C., Revuelta J. L., Frommer W. B., Rhee S. Y. **Uncovering Arabidopsis membrane protein interactome enriched in transporters using mating-based split ubiquitin assays and classification models.** *Front Plant Sci.* 2012;3:124.
30. Chen L., Ortiz-Lopez A., Jung A., Bush D. R. **ANT1, an aromatic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol.* 2001 Apr;125(4):1813-20.
31. Chen Y., Shin Y. K., Bassham D. C. **YKT6 is a core constituent of membrane fusion machineries at the *Arabidopsis* trans-Golgi network.** *J Mol Biol.* 2005 Jul 1;350(1):92-101.
32. Chen Z., Hartmann H. A., Wu M. J., Friedman E. J., Chen J. G., Pulley M., Schulze-Lefert P., Panstruga R., Jones A. M. **Expression analysis of the AtMLO gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins.** *Plant Mol Biol.* 2006 Mar;60(4):583-97.
33. Chen Z., Noir S., Kwaaitaal M., Hartmann H. A., Wu M. J., Mudgil Y., Sukumar P., Muday G., Panstruga R., Jones A. M. **Two seven-transmembrane domain MILDEW RESISTANCE LOCUS O proteins cofunction in *Arabidopsis* root thigmomorphogenesis.** *Plant Cell.* 2009 Jul;21(7):1972-91.
34. Chin K., Moeder W., Yoshioka K. **Biological Roles of Cyclic-Nucleotide Gated Ion Channels in Plants: What we know and don't know about this 20 member ion channel family.** *Botany* · Volume 87, Number 7, July 2009 , pp. 668-677(10)
35. Chopin F., Orsel M., Dorbe M. F., Chardon F., Truong H. N., Miller A. J., Krapp A., Daniel-Vedele F. **The *Arabidopsis* ATNRT2.7 Nitrate Transporter Controls Nitrate Content in Seeds.** *Plant Cell.* 2007 May 19(5):1590-602.
36. Christopher D. A., Borsics T., Yuen C. Y., Ullmer W., Andème-Ondzighi C., Andres M. A., Kang B. H., Staehelin L. A. **The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of *Arabidopsis* root and leaf cells.** *BMC Plant Biol.* 2007 Sep 19;7:48.

37. Clark K. L., Larsen P. B., Wang X., Chang C. **Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 28;95(9):5401-6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jul 21;95(15):9060.
38. Claverie J. M. **Gene number. What if there are only 30,000 human genes?** *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1255-7.
39. Clegg R. M. **Fluorescence resonance energy transfer.** *Curr Opin Biotechnol*. 1995 Feb;6(1):103-10.
40. Coleman M. A., Beernink P. T., Camarero J. A., Albala J. S. **Applications of functional protein microarrays: identifying protein-protein interactions in an array format.** *Methods Mol Biol*. 2007;385:121-30.
41. Consonni C., Humphry M. E., Hartmann H. A., Livaja M., Durner J., Westphal L., Vogel J., Lipka V., Kemmerling B., Schulze-Lefert P., Somerville S. C., Panstruga R. **Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis.** *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):716-20.
42. Cui J., Li P., Li G., Xu F., Zhao C., Li Y., Yang Z., Wang G., Yu Q., Li Y., Shi T. **AtPID: *Arabidopsis thaliana* protein interactome database--an integrative platform for plant systems biology.** *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan 36;999-1008.
43. Cusick M. E., Klitgord N., Vidal M., Hill D. E. **Interactome: gateway into systems biology.** *Hum Mol Genet*. 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R171-81.
44. Daniels M. J., Chrispeels M. J., Yeager M. **Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography.** *Mol Biol*. 1999 Dec 17;294(5):1337-49.
45. Davenport R. **Glutamate receptors in plants.** *Ann Bot (Lond)*. 2002 Nov;90(5):549-5
46. De Bodt S., Proost S., Vandepoele K., Rouzé P., Van de Peer Y. **Predicting protein-protein interactions in *Arabidopsis thaliana* through integration of orthology, gene ontology and co-expression.** *BMC Genomics*. 2009 Jun 29;10:288.
47. DeLille J. M., Sehnke P. C., Ferl R. J. **The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators.** *Plant Physiol*. 2001 May;126(1):35-8.
48. De Las Rivas J., de Luis A. **Interactome data and databases: different types of protein interaction.** *Comp Funct Genomics*. 2004;5(2):173-8.
49. Devoto A., Hartmann H. A., Piffanelli P., Elliott C., Simmons C., Taramino G., Goh C. S., Cohen F. E., Emerson B. C., Schulze-Lefert P., Panstruga R. **Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family.** *J Mol Evol*. 2003 Jan;56(1):77-88.
50. Devoto A., Piffanelli P., Nilsson I., Wallin E., Panstruga R., von Heijne G., Schulze-Lefert P. **Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants.** *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):34993-5004.

51. Diédhiou C. J., Popova O. V., Dietz K. J., Golldack D. **The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice.** *BMC Plant Biol.* 2008 Apr 28;8:49.
52. Dreyer I., Antunes S., Hoshi T., Müller-Röber B., Palme K., Pongs O., Reintanz B., Hedrich R. **Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately.** *Biophys J.* 1997 May;72(5):2143-50.
53. Dünwald M., Varshavsky A., Johnsson N. **Detection of transient *in vivo* interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum.** *Mol Biol Cell.* 1999 Feb;10(2):329-44.
54. Echevarría M., Zardoya, R. **Acuaporinas: los canales de agua celulares.** *Investigacion y Ciencia* 2006. 363 pag60-67.
55. Einarson M. B., Pugacheva E. N., Orlinick J. **Identification of Protein-protein Interactions with Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins.** Protein-Protein Interactions A molecular cloning manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. 2005.
56. Elliott C., Müller J., Miklis M., Bhat R. A., Schulze-Lefert P., Panstruga R. **Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop-loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein.** *Biochem J.* 2005 Jan 1;385(Pt 1):243-54.
57. Ewing R. M., Chu P., Elisma F., Li H., Taylor P., Climie S., McBroom-Cerajewski L., Robinson M.D., O'Connor L., Li M., Taylor R., Dharsee M., Ho Y., Heilbut A., Moore L., Zhang S., Ornatsky O., Bukhman Y. V., Ethier M., Sheng Y., Vasilescu J., Abu-Farha M., Lambert J. P., Duewel H. S., Stewart I. I., Kuehl B., Hogue K., Colwill K., Gladwish K., Muskat B., Kinach R., Adams S. L., Moran M. F., Morin G. B., Topaloglou T., Figeys D. **Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry.** *Mol Syst Biol.* 2007;3:89.
58. Fancy D. A. **Elucidation of protein-protein interactions using chemical cross-linking or label transfer techniques.** *Curr Opin Chem Biol.* 2000 Feb;4(1):28-33.
59. Ferl R. J., Manak M. S., Reyes M.F. **The 14-3-3s.** *Genome Biol.* 2002 Jun 27;3(7).
60. Fetchko M, Stagljar I. **Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions.** *Methods.* 2004 Apr;32(4):349-62.
61. Fetter K., Van Wilder V., Moshelion M., Chaumont F. **Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity.** *Plant Cell.* 2004 Jan;16(1):215-28.
62. Fields S., Song O. **A novel genetic system to detect protein-protein interaction.** *Nature* 1989 .340(6230)1989. 245-246.

63. Fotiadis D., Jenö P., Mini T., Wirtz S., Müller S. A., Fraysse L., Kjellbom P., Engel A. **Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes.** *J Biol Chem.* 2001 Jan 19;276(3):1707-14.
64. Freymark G., Diehl T., Miklis M., Romeis T., Panstruga R. **Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calcium-dependent protein kinases (CDPKs).** *Mol Plant Microbe Interact.* 2007 Oct;20(10):1213-21.
65. Fukaki H., Tasaka M. **Hormone interactions during lateral root formation.** *Plant Mol Biol.* 2009 Mar;69(4):437-49.
66. Gao G., Williams J. G., Campbell S. L. **Protein-Protein Interaction Analysis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.** *Protein-protein interactions:Methods and applications Methods in Molecular Biology*, Vol. 261, Haian Fu (Ed.) Humana Press, 2004.
67. Gavin A. C., Aloy P., Grandi P., Krause R., Boesche M., Marzioch M., Rau C., Jensen L. J., Bastuck S., Dümpelfeld B., Edelmann A., Heurtier M. A., Hoffman V., Hoefert C., Klein K., Hudak M., Michon A. M., Schelder M., Schirle M., Remor M., Rudi T., Hooper S., Bauer A., Bouwmeester T., Casari G., Drewes G., Neubauer G., Rick J. M., Kuster B., Bork P., Russell R. B., Superti-Furga G. **Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery.** *Nature.* 2006 Mar 30;440(7084):631-6.
68. Gavin A. C., Bosche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J. M., Michon A. M., Cruciat C. M., Remor M., Hofert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier M. A., Copley R. R., Edelmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G., Superti-Furga G. **Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes.** *Nature* Jan (2002); 415(6868):141-7.
69. Geisler M., Girin M., Brandt S., Vincenzetti V., Plaza S., Paris N., Kobae Y., Maeshima M., Billion K., Kolukisaoglu U. H., Schulz B., Martinoia E. **Arabidopsis immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters.** *Mol Biol Cell.* 2004 Jul;15(7):3393-405.
70. Geisler M., Kolukisaoglu H. U., Bouchard R., Billion K., Berger J., Saal B., Frangne N., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Dudler R., Blakeslee J. J., Murphy A. S., Martinoia E., Schulz B. **TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with Arabidopsis multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19.** *Mol Biol Cell.* 2003 Oct;14(10):4238-49.
71. Geisler-Lee J., O'Toole N., Ammar R., Provart N. J., Millar A. H., Geisler M. **A predicted interactome for Arabidopsis.** *Plant Physiol.* 2007 Oct;145(2):317-29.
72. Ghavidel A., Cagney G., Emili A. **A skeleton of the human protein interactome.** *Cell.* 2005 Sep 23;122(6):830-2.
73. Gietz, R. D., Woods R. A. **Transformation of yeast by the liac/ss carrier dna/peg method.** *Methods in Enzymology* 2002. 350: 87-96.

74. Gillissen B., Bürkle L., André B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W. B. **A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis***. *Plant Cell*. 2000 Feb;12(2):291-300.
75. Giot L., Bader J. S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y. Hao Y. L., Ooi C. E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y., Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., McDaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J., Neurath K., Ioime N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carrola S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., DaSilva A., Zhong J., Stanyon C. A., Finley R. L. Jr, White K. P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R. A., McKenna M. P., Chant J., Rothberg J. M. **A protein interaction map of *Drosophila melanogaster***. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1727-36.
76. Gobert A., Park G., Amtmann A., Sanders D., Maathuis F. J. ***Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport**. *J Exp Bot*. 2006;57(4):791-800.
77. Gojon A., Krouk G., Perrine-Walker F., Laugier E. **Nitrate transceptor(s) in plants**. *Exp Bot*. 2011 Apr;62(7):2299-308.
78. Gomes D., Agasse A., Thiébaud P., Delrot S., Gerós H., Chaumont F. **Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms**. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1788(6):1213-28.
79. Gräf P., Förstermann U., Closs E. I. **The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C**. *Br J Pharmacol*. 2001 Mar;132(6):1193-200.
80. Grant S. G., Jessee J., Bloom F. R., Hanahan D. **Diferential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4645-4649.
81. Grefen C., Städele K., Růzicka K., Obrdlík P., Harter K., Horák J. **Subcellular localization and *in vivo* interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members**. *Mol Plant*. 2008 Mar;1(2):308-20.
82. Guerrero C., Tagwerker C., Kaiser P., Huang L. **An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified *in vivo* cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network**. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Feb;5(2):366-78.
83. Güldener U., Heck S., Fielder T., Beinhauer J., Hegemann J. H. **A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast**. *Nucleic Acids Res*. 1996 Jul 1;24(13):2519-24.
84. Guo K. M., Babourina O., Christopher D. A., Borsic T., Rengel Z. **The cyclic nucleotide-gated channel AtCNGC10 transports Ca²⁺ and Mg²⁺ in *Arabidopsis***. *Physiol Plant*. 2010 Jul 1;139(3):303-12.

85. Guo F. Q., Wang R., Chen M., Crawford N. M. **The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth.** *Plant Cell*. 2001 Aug;13(8):1761-77.
86. Hachiya T., Mizokami Y., Miyata K., Tholen D., Watanabe C. K., Noguchi K. **Evidence for a nitrate-independent function of the nitrate sensor NRT1.1 in *Arabidopsis thaliana*.** *J Plant Res*. 2011 May;124(3):425-30.
87. Halford N. G., Hey S. J. **Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants.** *Biochem J*. 2009 Apr 15;419(2):247-59.
88. Hanahan D. **Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid.** *J Mol Biol* 1983,166, 557-580.
89. Harvengt P., Vlerick A., Fuks B., Wattiez R., Ruyschaert J. M., Homble F. **Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg(2+)-dependent and Ca(2+)-regulated kinase.** *Biochem J*. 2000 Nov 15;352 Pt 1:183-90.
90. Ho Y., Gruhler A., Heilbut A., Bader G. D., Moore L., Adams S. L., Millar A., Taylor P., Bennett K., Boutilier K., Yang L., Wolting C., Donaldson I., Schandorff S., Shewnarane J., Vo M., Taggart J., Goudreault M., Muskat B., Alfarano C., Dewar D., Lin Z., Michalickova K., Willems A. R., Sassi H., Nielsen P. A., Rasmussen K. J., Andersen J. R., Johansen L. E., Hansen L. H., Jespersen H., Podtelejnikov A., Nielsen E., Crawford J., Poulsen V., Sørensen B. D., Matthiesen J., Hendrickson R. C., Gleeson F., Pawson T., Moran M. F., Durocher D., Mann M., Hogue C. W., Figeys D., Tyers M. **Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry.** *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):180-3.
91. Hrabak E. M., Chan C. W., Gribskov M., Harper J. F., Choi J. H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H. G., Sussman M. R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J. K., Harmon A. C. **The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases.** *Plant Physiol*. 2003 Jun;132(2):666-80.
92. Hsu J. L., Wang L. Y., Wang S. Y., Lin C. H., Ho K. C., Shi F. K., Chang I. F. **Functional phosphoproteomic profiling of phosphorylation sites in membrane fractions of salt-stressed *Arabidopsis thaliana*.** *Proteome Sci*. 2009 Nov 10;7:42.
93. Hua B. G., Mercier R., Zielinski R., Berkowitz G. **Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel.** *Plant Physiology and Biochemistry* Vol 41, November 2003, pp 945-954.
94. Hughson F. M. **Membrane fusion: structure snared at last.** *Curr Biol*. 1999 Jan 28;9(2):R49-52.
95. Huynen M., Snel B., Lathe W. 3rd, Bork P. **Predicting protein function by genomic context: quantitative evaluation and qualitative inferences.** *Genome Res*. 2000 Aug;10(8):1204-10.

96. Isayenkov S.V., Maathuis F. J. **The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake.** *FEBS Lett.* 2008 May 14;582(11):1625-8.
97. Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., Sakaki Y. **A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 10;98(8):4569-74.
98. Javot H., Lauvergeat V., Santoni V., Martin-Laurent F., Güçlü J., Vinh J., Heyes J., Franck K. I., Schäffner A. R., Bouchez D. Maurel C. **Role of a single aquaporin isoform in root water uptake.** *Plant Cell.* 2003 Feb;15(2):509-22.)
99. Jensen L. J., Kuhn M., Stark M., Chaffron S., Creevey C., Muller J., Doerks T., Julien P., Roth A., Simonovic M., Bork P., von Mering C. **STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms.** *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37 D412-6.
100. Johansson I., Karlsson M., Johanson U., Larsson C., Kjellbom P. **The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance.** *Biochim Biophys Acta.* 2000 May 1;1465(1-2):324-42.
101. Johnsson N., Varshavsky A. **Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 25; 91(22):10340-4.
102. Juan D., Pazos F., Valencia A. **Co-evolution and co-adaptation in protein networks.** *FEBS Lett.* 2008 Apr 9;582(8):1225-30.
103. Kakani A., Li G., Peng Z. **Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis*.** *Planta.* 2009 Feb;229(3):645-57.
104. Kaplan B., Sherman T., Fromm H. **Cyclic nucleotide-gated channels in plants.** *FEBS Lett.* 2007 May 25;581(12):2237-46.
105. Kerrien S., Alam-Faruque Y., Aranda B., Bancarz I., Bridge A., Derow C., Dimmer E., Feuermann M., Friedrichsen A., Huntley R., Kohler C., Khadake J., Leroy C., Liban A., Liefert C., Montecchi-Palazzi L., Orchard S., Risse J., Robbe K., Roehert B., Thorneycroft D., Zhang Y., Apweiler R., Hermjakob H. **IntAct--open source resource for molecular interaction data.** *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D561-5.
106. Kim M. C., Lee S. H., Kim J. K., Chun H. J., Choi M. S., Chung W. S., Moon B. C., Kang C. H., Park C. Y., Yoo J. H., Kang Y. H., Koo S. C., Koo Y. D., Jung J. C., Kim S. T., Schulze-Lefert P., Lee S. Y., Cho M. J. **Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein. Isolation and characterization of a rice Mlo homologue.** *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19304-14.
107. Kim M. C., Panstruga R., Elliott C., Müller J., Devoto A., Yoon H. W., Park H. C., Cho M. J., Schulze-Lefert P. **Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley.** *Nature.* 2002 Mar 28;416(6879):447-51.

108. Köhler C., Merkle T., Neuhaus G. **Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J.* 1999 Apr;18(1):97-104.
109. Köhler C., Neuhaus G. **Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*.** *FEBS Lett.* 2000 Apr 14;471(2-3):133-6.
110. Kramer R. H., Molokanova E. **Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction.** *J Exp Biol.* 2001 Sep;204(Pt 17):2921-31.
111. Krogan N. J., Cagney G., Yu H., Zhong G., Guo X., Ignatchenko A., Li J., Pu S., Datta N., Tikuisis A. P., Punna T., Peregrín-Alvarez J. M., Shales M., Zhang X., Davey M., Robinson M. D., Paccanaro A., Bray J. E., Sheung A., Beattie B., Richards D. P., Canadien V., Lalev A., Mena F., Wong P., Starostine A., Canete M. M., Vlasblom J., Wu S., Orsi C., Collins S. R., Chandran S., Haw R., Rilstone J. J., Gandi K., Thompson N. J., Musso G., St Onge P., Ghanny S., Lam M. H., Butland G., Altaf-Ul A. M., Kanaya S., Shilatifard A., O'Shea E., Weissman J. S., Ingles C. J., Hughes T. R., Parkinson J., Gerstein M., Wodak S.J., Emili A., Greenblatt J. F. **Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature.* 2006 Mar 30;440(7084):637-43.
112. Kruse E., Uehlein N., Kaldenhoff R. **The aquaporins.** *Genome Biol.* 2006;7(2):206.
113. Kuroda K., Kato M., Mima J., Ueda M. **Systems for the detection and analysis of protein-protein interactions.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006 Jun;71(2):127-36.
114. Lalonde S., Ehrhardt D. W., Loqué D., Chen J., Rhee S. Y, Frommer W. B. **Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations.** *Plant J.* 2008 Feb;53(4):610-35.
115. Latz A., Becker D., Hekman M., Müller T., Beyhl D., Marten I., Eing C., Fischer A., Dunkel M., Bertl A., Rapp U. R., Hedrich R. **TPK1, a Ca(2+)-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins.** *Plant J.* 2007 Nov;52(3):449-59.
116. Lehming N. **Analysis of protein-protein proximities using the split-ubiquitin system.** *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2002 Oct;1(3):230-8.
117. Leng Q., Mercier R. W., Hua B. G., Fromm H., Berkowitz G. A. **Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels.** *Plant Physiol.* 2002 Feb;128(2):400-10.
118. Levy E. D., Pereira-Leal J. B. **Evolution and dynamics of protein interactions and networks.** *Curr Opin Struct Biol.* 2008 Jun;18(3):349-57.
119. Lewis A. C., Saeed R., Deane C. M. **Predicting protein-protein interactions in the context of protein evolution.** *Mol Biosyst.* 2010 Jan;6(1):55-64.

120. Li G., Yan Q., Oen H. O., Lennarz W. J. **A specific segment of the transmembrane domain of Wbp1p is essential for its incorporation into the oligosaccharyl transferase complex.** *Biochemistry Sep* (2003); 42(37):11032-9 .
121. Li S., Armstrong C. M., Bertin N., Ge H., Milstein S., Boxem M., Vidalain P. O., Han J. D., Chesneau A., Hao T., Goldberg D. S., Li N., Martinez M., Rual J. F., Lamesch P., Xu L., Tewari M., Wong S. L., Zhang L. V., Berriz G. F., Jacotot L., Vaglio P., Reboul J., Hirozane-Kishikawa T., Li Q., Gabel H. W., Elewa A., Baumgartner B., Rose D. J., Yu H., Bosak S., Sequerra R., Fraser A., Mango S. E., Saxton W. M., Strome S., Van Den Heuvel S., Piano F., Vandenhaute J., Sardet C., Gerstein M., Doucette-Stamm L., Gunsalus K C., Harper J. W., Cusick M. E., Roth F. P., Hill D. E., Vidal M. **A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*.** *Science*. 2004 Jan 23;303(5657):540-3.
122. Lin H., Yang Y., Quan R., Mendoza I., Wu Y., Du W., Zhao S., Schumaker K. S., Pardo J. M., Guo Y. **Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*. 2009 May;21(5):1607-19.
123. Lin M., Shen X., Chen X. **PAIR: the predicted *Arabidopsis* interactome resource.** *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D1134-40.
124. Liu G., Ji Y., Bhuiyan N. H., Pilot G., Selvaraj G., Zou J., Wei Y. **Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*. 2010 Nov;22(11):3845-63.
125. Liu H., Wang Q., Yu M., Zhang Y., Wu Y., Zhang H. **Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris L.*) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na/H antiporter gene, *AtNHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots.** *Plant Cell Environ*. 2008 Sep;31(9):1325-34.
126. Longtine M. S., McKenzie A., 3rd, Demarini D. J., *et al.* **Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Sacharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1998;14:953-961.
127. Lu L., Lu H., Skolnick J. **MULTIPROSPECTOR: an algorithm for the prediction of protein-protein interactions by multimeric threading.** *Proteins*. 2002 Nov 15;49(3):350-64.
128. Machida K., Mayer B. J. **Detection of protein-protein interactions by far-western blotting.** *Methods Mol Biol*. 2009;536:313-29.
129. Martre P., Morillon R., Barrieu F., North G. B., Nobel P. S., Chrispeels M. J. **Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit.** *Plant Physiol*. 2002 Dec;130(4):2101-10
130. Massaad M. J. and Herscovics A., **Interaction of the endoplasmic reticulum alpha 1,2-mannosidase Mns1p with Rer1p using the split-ubiquitin system.** *J. Cell Sci*. 2001. 114 Pt 24 pp. 4629–463514.

131. Matsumoto T., Lian H. L., Su W. A., Tanaka D., Liu C., Iwasaki I., Kitagawa Y. **Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice.** *Plant Cell Physiol.* 2009 Feb;50(2):216-29.
132. Maurel C. **Plant aquaporins: novel functions and regulation properties.** *FEBS Lett.* 2007 May 25;581(12):2227-36.
133. Maurel C., Verdoucq L., Luu D. T., Santoni V. **Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions.** *Annu Rev Plant Biol.* 2008;59:595-624.
134. Messing J., Crea R., Seeburg P. H. **A system for Shotgun DNA sequencing.** *Nucleic Acids Res* 1981;9:309-321.
135. Miernyk J. A., Thelen J. J. **Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions.** *Plant J.* 2008 Feb;53(4):597-609.
136. Miller A. J., Fan X., Orsel M., Smith S. J., Wells D. M. **Nitrate transport and signalling.** *J Exp Bot.* 2007;58(9):2297-306.
137. Miller J. P., Lo R. S., Ben-Hur A., Desmarais C., Stagljar I., Noble W. S., Fields S. **Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 23;102(34):12123-8.
138. Morsy M., Gouthu S., Orchard S., Thorneycroft D., Harper J. F., Mittler R., Cushman J.C. **Charting plant interactomes: possibilities and challenges.** *Trends Plant Sci.* 2008 Apr;13(4):183-91.
139. Moubayidin L., Di Mambro R., Sabatini S. **Cytokinin-auxin crosstalk.** *Trends Plant Sci.* 2009 Oct;14(10):557-62.
140. Mravec J., Kubes M., Bielach A., Gaykova V., Petrásek J., Skůpa P., Chand S., Benková E., Zazimalová E., Friml J. **Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development.** *Development.* 2008 Oct;135(20):3345-54.
141. Muñoz S., Cazettes C., Fizames C., Gaymard F., Tillard P., Lepetit M., Lejay L., Gojon A. **Transcript profiling in the chl1-5 mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1** *Plant Cell.* 2004 Sep;16(9):2433-47.
142. Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J. B., Engel A., Fujiyoshi Y. **Structural determinants of water permeation through aquaporin-1.** *Nature.* 2000 Oct 5;407(6804):599-605.
143. Nadeau O., Carlson G. M. **Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking.** A molecular cloning manual Protein-Protein Interactions Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition. *Cold Spring Harbor, New York.* 2005.
144. Niegowskia D., Hedréna M., Nordlunda P., Eshaghi S. **A simple strategy towards membrane protein purification and crystallization.** *International Journal of Biological Macromolecules* 39 (2006) 83–87.

145. Niihama M., Uemura T., Saito C., Nakano A., Sato M. H., Tasaka M., Morita M. T. **Conversion of functional specificity in Qb-SNARE VTI1 homologues of *Arabidopsis*.** *Curr Biol.* 2005 Mar 29;15(6):555-60.
146. Nikolic M., Cesco S., Monte R., Tomasi N., Gottardi S., Zamboni A., Pinton R., Varanini Z. **Nitrate transport in cucumber leaves is an inducible process involving an increase in plasma membrane H⁺-ATPase activity and abundance.** *BMC Plant Biol.* 2012 May 9;12(1):66.
147. Nooren I. M., Thornton J. M. **Diversity of protein-protein interactions.** *EMBO J.* 2003 Jul 15;22(14):3486-92.
148. Nyblom M., Frick A., Wang Y., Ekvall M., Hallgren K., Hedfalk K., Neutze R., Tajkhorshid E., Törnroth-Horsefield S. **Structural and functional analysis of SoPIP2;1 mutants adds insight into plant aquaporin gating.** *J. Mol Biol.* 2009 Apr 3;387(3):653-68
149. Obrdlik P., El-Bakkoury M., Hamacher T., Cappellaro C., Vilarino C., Fleischer C., Ellerbrok H., Kamuzinzi R., Ledent V., Blaudez D., Sanders D., Revuelta J. L., Boles E., André B., Frommer W. B. **K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 17;101(33):12242-7 .
150. Okumoto S., Pilot G. **Amino Acid Export in Plants: A Missing Link in Nitrogen Cycling.** *Mol Plant.* 2011 Feb 15.
151. Okumoto S., Schmidt R., Tegeder M., Fischer W. N., Rentsch D., Frommer W. B., Koch W. **High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*.** *J Biol Chem.* 2002 Nov 22;277(47):45338-46.
152. Opalski K. S., Schultheiss H., Kogel K. H., Hückelhoven R. **The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis f.sp. hordei*.** *Plant J.* 2005 Jan;41(2):291-303.
153. Orsel M., Chopin F., Leleu O., Smith S. J., Krapp A., Daniel-Vedele F., Miller A. J. **Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction.** *Plant Physiol.* 2006 Nov;142(3):1304-17.
154. Pan Y., Konermann L. **Membrane protein structural insights from chemical labeling and mass spectrometry.** *Analyst.* 2010 Jun;135(6):1191-200.
155. Pardo J. M., Cubero B., Leidi E. O., Quintero F. J. **Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance.** *J Exp Bot.* 2006;57(5):1181-99.
156. Pasch J.C., Nickelsen J, Schünemann D. **The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Dec;69(4):440-7.

157. Pathak R., Imperiali B. **A dual affinity tag on the 64-kDa Nlt1p subunit allows the rapid characterization of mutant yeast oligosaccharyl transferase complexes.** *Arch. Biochem. Biophys.* Feb (1997); 338(1):1-6.

158. Pazos F., Valencia A. **Similarity of phylogenetic trees as indicator of protein-protein interaction.** *Protein Eng.* 2001 Sep;14(9):609-14.

159. Pazos F., Valencia A. **In silico two-hybrid system for the selection of physically interacting protein pairs.** *Proteins.* 2002 May 1;47(2):219-27.

160. Pernisová M., Klíma P., Horák J., Válková M., Malbeck J., Soucek P., Reichman P., Hoyerová K., Dubová J., Friml J., Zazímalová E., Hejátko J. **Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 3;106(9):3609-14.

161. Petracek M. E., Longtine M. S. **PCR-based engineering of yeast genome.** *Methods Enzymol.* 2002;350:445-69.

162. Pflieger K. D., Eidne K. A. **Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET).** *Nature Methods* 2006 3, 165 - 174 .

163. Phizicky E. M., Fields S. **Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Análisis.** *Microbiological Reviews* (1995) .pp.94-123.

164. Pickart C. M. **Ubiquitin.** *Plenum Press, New York* (Rechsteiner, M., ed) 1988.pp. 77-100.

165. Pieroni E., de la Fuente van Bentem S., Mancosu G., Capobianco E., Hirt H., de la Fuente A. **Protein networking: insights into global functional organization of proteomes.** *Proteomics.* 2008 Feb;8(4):799-816.

166. Pilot G., Gaymard F., Mouline K., Chérel I., Sentenac H. **Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant.** *Plant Mol Biol.* 2003 Mar;51(5):773-87.

167. Pilot G., Lacombe B., Gaymard F., Cherel I., Boucherez J., Thibaud J. B., Sentenac H. **Guard cell inward K⁺ channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2.** *J Biol Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3215-21.

168. Pilot G., Stransky H., Bushey D. F., Pratelli R., Ludewig U., Wingate V. P., Frommer W.B. **Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from Hydathodes of *Arabidopsis* leaves.** *Plant Cell.* 2004 Jul;16(7):1827-40.

169. Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M., Frugier F. **MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*.** *Plant J.* 2011 Feb;65(4):622-33.

170. Popescu S. C., Popescu G. V., Bachan S., Zhang Z., Seay M., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S. P. **Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13;104(11):4730-5.
171. Popescu S. C., Snyder M., Dinesh-Kumar S. ***Arabidopsis* protein microarrays for the high-throughput identification of protein-protein interactions.** *Plant Signal Behav.* 2007 Sep;2(5):416-20.
172. Prak S., Hem S., Boudet J., Viennois G., Sommerer N., Rossignol M., Maurel C., Santoni V. **Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress.** *Mol Cell Proteomics.* Jun (2008);7(6):1019-30.
173. Pratelli R., Sutter J. U., Blatt M. R. **A new catch in the SNARE.** *Trends Plant Sci.* 2004 Apr;9(4):187-95.
174. Pratelli R., Voll L. M., Horst R. J., Frommer W. B., Pilot G. **Stimulation of nonselective amino acid export by glutamine dumper proteins.** *Plant Physiol.* 2010 Feb;152(2):762-73.
175. Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M., Séraphin B. **The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification.** *Methods.* 2001 Jul;24(3):218-29.
176. Quintero F. J., Martinez-Atienza J., Villalta I., Jiang X., Kim W. Y., Ali Z., Fujii H., Mendoza I., Yun D. J., Zhu J. K., Pardo J. M. **Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 8;108(6):2611-6.
177. Rahim G., Bischof S., Kessler F., Agne B. **In vivo interaction between atToc33 and atToc159 GTP-binding domains demonstrated in a plant split-ubiquitin system.** *J Exp Bot.* 2009;60(1):257-67.
178. Reinders A., Schulze W., Kühn C., Barker L., Schulz A., Ward J. M., Frommer W. B. **Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element.** *Plant Cell.* 2002 Jul;14(7):1567-77.
179. Reinders. A, Schulze W., Thaminy S., Stagljar I., Frommer W. B., Ward J. M. **Intra- and intermolecular interactions in sucrose transporters at the plasma membrane detected by the split-ubiquitin system and functional assays.** *Structure* 10 6 2002, pp. 763–772.
180. Richardson L. G., Howard A. S., Khoo N., Gidda S. K., McCartney A., Morphy B. J., Mullen R. T. **Protein-Protein Interaction Network and Subcellular Localization of the *Arabidopsis Thaliana* ESCRT Machinery.** *Front Plant Sci.* 2011;2:20.
181. Royer C. **Protein-protein interactions. Outline of the thermodynamic and structural principles governing the ways that proteins interact with other proteins.** Previously published in the Biophysics Textbook Online (BTOL). 1999.

182. Rual J. F., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G. F., Gibbons F. D., Dreze M., Ayivi-Guedehoussou N., Klitgord N., Simon C., Boxem M., Milstein S., Rosenberg J., Goldberg D. S., Zhang L.V., Wong S. L., Franklin G., Li S., Albala J. S., Lim J., Fraughton C., Llamosas E., Cevik S., Bex C., Lamesch P., Sikorski R. S., Vandenhaute J., Zoghbi H. Y., Smolyar A., Bosak S., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Cusick M. E., Hill D. E., Roth F. P., Vidal M. **Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network.** *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1173-8.
183. Ruden D. M., Ma J., Li Y., Wood K., Ptashne M. **Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences.** *Nature*. 1991 Mar 21;350(6315):250-2.
184. Russell R. B., Alber F., Aloy P., Davis F. P., Korkin D., Pichaud M., Topf M., Sali A. **A structural perspective on protein-protein interactions.** *Curr Opin Struct Biol*. 2004 Jun;14(3):313-24.
185. Sambrook J., Russell D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY2001.
186. Sánchez-Rodríguez C., Estévez J. M., Llorente F., Hernández-Blanco C., Jordá L., Pagán I., Berrocal M., Marco Y, Somerville S., Molina A. **The ERECTA Receptor-Like Kinase Regulates Cell Wall-Mediated Resistance to Pathogens in *Arabidopsis thaliana*.** *Mol Plant Microbe Interact*. 2009 Aug;22(8):953-63.
187. Sanderfoot A. A., Kovaleva V., Bassham D. C., Raikhel N. V. **Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the *Arabidopsis* cell.** *Mol Biol Cell*. 2001 Dec;12(12):3733-43.
188. Sanderfoot A. A., Kovaleva V., Zheng H., Raikhel N. V. **The t-SNARE AtVAM3p resides on the prevacuolar compartment in *Arabidopsis* root cells.** *Plant Physiol*. 1999 Nov;121(3):929-38.
189. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitor.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.
190. Santi S., Locci G., Monte R., Pinton R., Varanini Z. **Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms.** *J Exp Bot*. 2003 Aug;54(389):1851-64.
191. Sato Y., Sakaguchi M. **Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na⁺/H⁺ exchanger family.** *J Biochem*. 2005 Oct;138(4):425-31.
192. Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W. B., Flügge U. I., Kunze R. **ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins.** *Plant Physiol*. 2003 Jan;131(1):16-26.
193. Scheper W., Thaminy S., Kais S., Stagljar I., Romisch K. **Coordination of N-glycosylation and protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane by Sss1 protein.** *J. Biol. Chem*. 278 2003, pp. 37998–38003.

194. Schulze W. X., Reinders A., Ward J., Lalonde S., Frommer W. B. **Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system.** *BMC Biochem.* 2003 Mar 18;4:3.
195. Schüssler M. D., Alexandersson E., Bienert G. P., Kichey T., Laursen K. H., Johanson U., Kjellbom P., Schjoerring J. K., Jahn T. P. **The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J.* 2008 Dec;56(5):756-67.
196. Sehnke P. C., DeLille J. M., Ferl R. J. **Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity.** *Plant Cell.* 2002;14 Suppl:S339-54.
197. Selenko P., Wagner G. **NMR mapping of protein interactions in living cells.** *Nat Methods.* 2006 Feb;3(2):80-1).
198. Shin R., Jez J. M., Basra A., Zhang B., Schachtman D. P. **14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism.** *FEBS Lett.* 2011 Jan 3;585(1):143-7.
199. Shoemaker B. A., Panchenko A. R. Deciphering protein-protein interactions. Part II. **Computational methods to predict protein and domain interaction partners.** *PLoS Comput Biol.* 2007 Apr 27;3(4):e43.
200. Skoog F., Miller C. O. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*.** *Symp Soc Exp Biol.* 1957;11:118-30.
201. Smith G. R., Sternberg M. J. **Prediction of protein-protein interactions by docking methods.** *Curr Opin Struct Biol.* 2002 Feb;12(1):28-35.
202. Smoot M., Ono K., Ruscheinski J., Wang P. L., Ideker T. **Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization.** *Bioinformatics.* 2011 February 1; 27(3): 431–432.
203. Sommer A., Geist B., Da Ines O., Gehwolf R., Schäffner A. R., Obermeyer G. **Ectopic expression of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane intrinsic protein 2 aquaporins in lily pollen increases the plasma membrane water permeability of grain but not of tube protoplasts.** *Sommer. New Phytol.* 2008;180(4):787-97.
204. Stagljar I., Fields S. **Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies.** *Trends Biochem Sci.* 2002 Nov; 27(11):559-63.
205. Stagljar I., Korostensky C., Johnsson N., Heesen S. **A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5187-92.
206. Stark C., Breitkreutz B. J., Reguly T., Boucher L., Breitkreutz A., Tyers M. **BioGRID: a general repository for interaction datasets.** *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34.

207. Sung M. K., Huh W. K. **Bimolecular fluorescence complementation analysis system for *in vivo* detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*. 2007 Sep;24(9):767-75.
208. Sunkar R., Kaplan B., Bouché N., Arazi T., Dolev D., Talke I. N., Maathuis F. J., Sanders D., Bouchez D., Fromm H. **Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGC1 gene confer Pb2+ tolerance.** *Plant J*. 2000 Nov;24(4):533-42.
209. Szilágyi A., Grimm V., Arakaki A. K., Skolnick J. **Prediction of physical protein-protein interactions.** *Phys Biol*. 2005 Jun;2(2):S1-16.
210. Talke I. N., Blaudez D., Maathuis F. J., Sanders D. **CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling?** *Trends Plant Sci*. 2003 Jun;8(6):286-93.
211. Tanaka M., Wallace I. S., Takano J., Roberts D. M., Fujiwara T. **NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*. 2008 Oct;20(10):2860-75.
212. Tarassov K., Messier V., Landry C. R., Radinovic S., Serna Molina M. M., Shames I., Malitskaya Y., Vogel J., Bussey H., Michnick S. W. **An *in vivo* map of the yeast protein interactome.** *Science*. 2008 Jun 13;320(5882):1465-70.
213. Temmei Y., Uchida S., Hoshino D., Kanzawa N., Kuwahara M., Sasaki S., Tsuchiya T. **Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation.** *FEBS Lett*. 2005 Aug 15;579(20):4417-22.
214. Thaminy S., Auerbach D., Arnoldo A., Stagljar I. **Identification of novel ErbB3-interacting proteins using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid technology.** *Genome Res*. 13 7 2003, pp. 1744–1753.
215. Theologis A., Ecker J. R., Palm C. J., Federspiel N. A., Kaul S., White O., Alonso J., Altafi H., Araujo R., Bowman C. L., Brooks S. Y., Buehler E., Chan A., Chao Q., Chen H., Cheuk R. F., Chin C. W., Chung M. K., Conn L., Conway A. B., Conway A. R., Creasy T. H., Dewar K., Dunn P., Etgu P., Feldblyum T. V., Feng J., Fong B., Fujii C. Y., Gill J. E., Goldsmith A. D., Haas B., Hansen N. F., Hughes B., Huizar L., Hunter J. L., Jenkins J., Johnson-Hopson C., Khan S., Khaykin E., Kim C. J., Koo H. L., Kremenetskaia I., Kurtz D. B., Kwan A., Lam B., Langin-Hooper S., Lee A., Lee J. M., Lenz C. A., Li J. H., Li Y., Lin X., Liu S. X., Liu Z. A., Luros J. S., Maiti R., Marziali A., Militscher J., Miranda M., Nguyen M., Nierman W. C., Osborne B. I., Pai G., Peterson J., Pham P. K., Rizzo M., Rooney T., Rowley D., Sakano H., Salzberg S. L., Schwartz J. R., Shinn P., Southwick A. M., Sun H., Tallon L. J., Tambunga G., Toriumi M. J., Town C. D., Utterback T., Van Aken S., Vaysberg M., Vysotskaia V. S., Walker M., Wu D., Yu G., Fraser C. M., Venter J. C., Davis R. W. **Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*.** *Nature*. 2000, 408(6814):816-20.
216. Titapiwatanakun B., Murphy A. S. **Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition.** *J Exp Bot*. 2009;60(4):1093-107.

217. To J. P., Deruère J., Maxwell B. B., Morris V. F., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., Kieber J. J. **Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay.** *Plant Cell*. 2007 Dec;19(12):3901-14.
218. Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., Tajkhorshid E., Neutze R., Kjellbom P. **Structural mechanism of plant aquaporin gating.** *Nature*. 2006 Feb 9;439(7077):688-94.
219. de la Torre V., Valles A., Gómez R., China, G., Pons T. (2003) **Interacciones proteína-proteína: Bases de datos y métodos teóricos de predicción.** *Biotecnología Aplicada*. 2003 20(4):201-208.
220. Tsay Y. F., Schroeder J.I., Feldmann K. A., Crawford N. M. **The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter.** *Cell*. 1993 Mar 12;72(5):705-13.
221. Tsay Y. F., Chiu C. C., Tsai C. B., Ho C. H., Hsu P. K. **Nitrate transporters and peptide transporters.** *FEBS Lett*. 2007 May 25;581(12):2290-300.
222. Tuncbag N., Gursoy A, Keskin O. **Prediction of protein-protein interactions: unifying evolution and structure at protein interfaces.** *Phys Biol*. 2011 Jun;8(3):035006.
223. Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A., Judson R. S., Knight J. R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li .Y, Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S., Rothberg J. M. **A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature*. 2000 Feb 10;403(6770):601-3.
224. Urbach S., Chérel I., Sentenac H., Gaymard F. **Biochemical characterization of the *Arabidopsis* K⁺ channels *KAT1* and *AKT1* expressed or co-expressed in insect cells.** *Plant J*. 2000 Aug;23(4):527-38.
225. Van Leene J., Stals H., Eeckhout D., Persiau G., Van De Slijke E., Van Isterdael G., De Clercq A., Bonnet E., Laukens K., Remmerie N., Henderickx K., De Vijlder T., Abdelkrim A., Pharazyn A., Van Onckelen H., Inzé D., Witters E., De Jaeger G. **A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*.** *Mol Cell Proteomics*. 2007 Jul;6(7):1226-38.
226. Vander Willigen C., Postaire O., Tournaire-Roux C., Boursiac Y., Maurel C. **Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds.** *Plant Cell Physiol*. 2006 Sep;47(9):1241-50.
227. Vaynberg J., Qin J. **Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy.** *Trends Biotechnol*. 2006 Jan;24(1):22-7.
228. Verdoucq L., Grondin A., Maurel C. **Structure-function analysis of plant aquaporin *AtPIP2;1* gating by divalent cations and protons.** *Biochem J*. 2008 Nov 1;415(3):409-16.

229. Voelker C., Schmidt D., Mueller-Roeber B., Czempinski K. **Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta.** *Plant J.* 2006 Oct;48(2):296-306.
230. von Mering C., Jensen L. J., Kuhn M., Chaffron S., Doerks T., Krüger B., Snel B., Bork P. **STRING 7-recent developments in the integration and prediction of protein interactions.** *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35 D358-62.
231. von Mering C., Jensen L. J., Snel B., Hooper S. D., Krupp M., Foglierini M., Jouffre N., Huynen M. A., Bork P. **STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms.** *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33:D433-7.
232. Wipf D., Ludewig U., Tegeder M., Rentsch D., Koch W., Frommer W. B. **Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals.** *Trends Biochem Sci.* 2002 Mar;27(3):139-47.
233. Wudick M. M., Luu D. T., Maurel C. **A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins.** *New Phytol.* 2009 Oct;184(2):289-302.
234. Yan A., Ahmed E., Yan Q., Lennarz W. J. **New findings on interactions among the yeast oligosaccharyl transferase subunits using a chemical cross-linker.** *J. Biol. Chem.* Aug (2003); 278(35):33078-87
235. Yang T., Poovaiah B. W. **Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants.** *Trends Plant Sci.* 2003 Oct;8(10):505-12
236. Yano D., Sato M., Saito C., Sato M. H., Morita M. T., Tasaka M. **A SNARE complex containing SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for *Arabidopsis* shoot gravitropism.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8589-94
237. Walch-Liu P., Forde B. G. **Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture.** *Plant J.* 2008 Jun;54(5):820-8.
238. Wallace I. S., Roberts D. M. **Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels.** *Biochemistry.* 2005 Dec 27;44(51):16826-34
239. Wang B., Nguyen M., Breckenridge D. G., Stojanovic M., Clemons P. A., Kuppig S., Shore G. C. **Uncleaved BAP31 in association with A4 protein at the endoplasmic reticulum is an inhibitor of Fas-initiated release of cytochrome c from mitochondria.** *J. Biol. Chem.* 2003 Apr 18;278(16):14461-8.
240. Wang H., Kakaradov B., Collins S. R., Karotki L., Fiedler D., Shales M., Shokat K. M., Walther T. C., Krogan N. J., Koller D. **A complex-based reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* interactome.** *Mol Cell Proteomics.* 2009 Jun;8(6):1361-81.

241. Wang W., Hall A. E., O'Malley R., Bleecker A. B. **Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):352-7.
242. Wang Z., Jiang Y., Lu L., Huang R., Hou Q., Shi F. **Molecular mechanisms of cyclic nucleotide-gated ion channel gating.** *J Genet Genomics.* 2007 Jun;34(6):477-85.
243. Wessel D., Flügge U. I. **A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.** *Analytical Biochemistry* 1984 April 138(1):141-143.
244. Wu Y., Li Q., Chen X. Z. **Detecting protein-protein interactions by Far western blotting.** *Nat Protoc.* 2007;2(12):3278-84.
245. Wudick M. M., Luu D. T., Maurel C. **A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins.** *New Phytol.* 2009 Oct;184(2):289-302.
246. Xia Y., Lu L. J., Gerstein M. **Integrated prediction of the helical membrane protein interactome in yeast.** *J Mol Biol.* 2006 Mar 17;357(1):339-49.
247. Xu F., Li G., Zhao C., Li Y., Li P., Cui J., Deng Y., Shi T. **Global protein interactome exploration through mining genome-scale data in *Arabidopsis thaliana*.** *BMC Genomics.* 2010 Nov 2;11 Suppl 2:S2.
248. Yamaguchi T., Aharon G. S., Sottosanto J. B., Blumwald E. **Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 1;102(44):16107-12.
249. Zelazny E., Borst J. W., Muylaert M., Batoko H., Hemminga M. A., Chaumont F. **FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 24;104(30):12359-64.
250. Zhang Z., Feng X., Du W., Luo Q., Liu B-F. **Microseparation of membrane proteins.** *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 364 – 373
251. Zhao K., Marmorstein R. **Proteins Co-crystallization for Structure Determination.** Protein-Protein Interactions A molecular cloning manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition. *Cold Spring Harbor, New York.* 2005.
252. Zheng H., von Mollard G. F., Kovaleva., Stevens T. H., Raikhel N. V. **The plant vesicle-associated SNARE AtVTI1a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment.** *Mol Biol Cell.* 1999 Jul;10(7):2251-64.

