



**Universidad Miguel Hernández de Elche**

**Análisis de la localización subcelular  
de la proteína VCC de Arabidopsis  
y del efecto de las condiciones de cultivo  
sobre el fenotipo del mutante vcc-2**

**Estefanía Vidaurre Pinto**

Tutores:

José Luis Micol Molina

Carla Navarro Quiles

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2022-2023

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

CARLA NAVARRO QUILES, Doctora por la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

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

Carla Navarro Quiles

José Luis Micol Molina

Elche, 20 de junio de 2023

## I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Se han publicado descripciones discrepantes del fenotipo del mutante *vasculature complexity and connectivity-2* (*vcc-2*) y de la localización subcelular de la proteína VCC de *Arabidopsis*. Roschztardt et al. (2014) y Yanagisawa et al. (2021) afirmaron que el patrón de venación de los cotiledones de *vcc-2* es más simple e inconexo que el silvestre, y que VCC se localiza en la membrana celular. Según Wilson-Sánchez et al. (2018), las hojas de *vcc-2* muestran asimetría bilateral, y VCC radica en el retículo endoplásmico. Hemos intentado establecer si tales discrepancias se deben a diferentes condiciones de cultivo o a diseños erróneos de los transgenes obtenidos para la visualización de proteínas de fusión entre VCC y una proteína fluorescente. Hemos comprobado que la temperatura y el fotoperiodo no modifican el patrón de venación de los cotiledones ni la simetría bilateral de las hojas de los mutantes estudiados, excepto *vcc-2*, cuya asimetría bilateral se incrementó en medios gelificados con Gelrite. Nuestro análisis mediante microscopía confocal de superresolución reveló que la proteína de fusión VCC:CFP es aparentemente citoplásmica. También hemos diseñado e iniciado la construcción de las fusiones traduccionales  $35S_{pro}:GFP:VCC$  (con la GFP unida al extremo amino de VCC en la proteína de fusión resultante) y  $35S_{pro}:VCC:YFP$  (con una proteína fluorescente más fotoestable y adecuada para la nanoscopia que la GFP).

**Palabras clave:** *Arabidopsis*, VCC, patrón de venación, localización subcelular, citoquininas.

Two distinct descriptions have been published of the phenotype of the *vasculature complexity and connectivity-2* (*vcc-2*) *Arabidopsis* mutant, as well as of the subcellular localization of the VCC protein. Roschztardt et al. (2014) and Yanagisawa et al. (2021) claimed that the venation pattern of *vcc-2* cotyledons is simpler and disconnected compared to wild type, and that VCC localizes at the cell membrane. According to Wilson-Sánchez et al. (2018), *vcc-2* leaves exhibit bilateral asymmetry, and VCC localizes at the endoplasmic reticulum. We attempted to establish whether these discrepancies are due to different growth conditions or defective design of the transgenes used for obtaining and visualizing VCC fusion proteins. We confirmed that temperature and photoperiod do not modify the venation pattern of cotyledons or the bilateral symmetry of the studied mutants, except for *vcc-2*, whose leaf bilateral asymmetry increased in media gelified with Gelrite. Our super-resolution confocal microscopy analysis revealed that VCC:CFP is apparently cytoplasmic. We also designed and initiated the construction of the translational fusions  $35S_{pro}:GFP:VCC$  (with GFP attached to the N-terminus of VCC in the resulting fusion protein) and  $35S_{pro}:VCC:YFP$  (with a fluorescent protein more photostable and suitable for nanoscopy than GFP).

**Keywords:** *Arabidopsis*, VCC, venation pattern, subcellular localization, cytokinins.