

UCH-FC
MA B-B
P 438c
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



“Caracterización celular y molecular de los efectos de Sortin2 en *A. thaliana*”

Memoria de Título
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de
Magister en Ciencias Biológicas

Por

PATRICIO IGNACIO PÉREZ HENRÍQUEZ

Marzo, 2012
Santiago - Chile

Director de Tesis: Dr. Lorena Norambuena Morales
Co-Director de Tesis: Michael Handford
Laboratorio Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

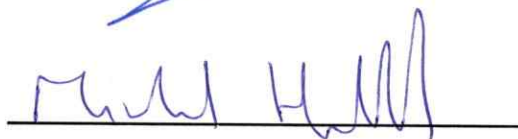
Patricio Ignacio Pérez Henríquez

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 Marzo 2012.

Director de Tesis:
Dr. Lorena Norambuena



Co-Director de Tesis
Dr. Michael Handford



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Claudia Stange



Dr. Liliana Cardemil



DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a LA MEJOR familia del mundo, la mía. Por todo el amor, apoyo y compañía que me han dado siempre desde niño hasta ahora, un niño más grande. Les amo a todos.

Para ti amor, por tu comprensión, aún cuando soy insoportable, te amo.



*"Usted no puede depender de sus ojos,
cuando su imaginación está desenfocada"*

Mark Twain.

"MI PATRIA ES EL MUNDO Y MI RELIGION ES HACER EL BIEN"

Thomas Paine

BIOGRAFIA



Probablemente esta parte de la tesis sea la primera que muchos van a leer, así que intentaré hacerlo bien y entretenido, o sea, corto.

Crecí en Iquique, una ciudad bella. Descubrí al tiempo de llegar a Santiago que esta ciudad también es bella. Ahora, a pesar, de que me gustaría volver a mi tierra me siento cómodo aquí aún con los tacos eternos, la micro llena y la falta de playa donde capear el calor.

Hijo de mi padre, Caupolicán, y mi madre, Adriana. Hermano de Juan Pablo, Marco y Sandra. Tío de Juan Ignacio, Sandra, Marco, Diego e Ivania. Co-amor de fuser, un perro con personalidad de *H. sapiens*. Enamorado de Carolina. Amante de mi guitarra e Ilusionista de una realidad paralela en donde canto afinado. Estudiante de la Chile, de pregrado, magister y doctorado. Si hasta el Postítulo en proyectos lo hice en la Chile. Que manera de ser Azul!. Avatar!. Embobado con el análisis político y reacio a ejercer la política. Que miedo!. Ese soy yo... un tipo común con gente alrededor que no lo es, porque son todos excepcionales.

Mi vida gira entorno al trabajo en el laboratorio, sin embargo, me las he arreglado para encontrar vida plena en esta monotonía del pipeteo. Encontré el amor en el laboratorio mientras hacía mi tesis de pregrado. Logré enamorar, no sé cómo, ha una mujer hermosamente indescriptible, "la Caro". Además forjé, grandes amistades, que sin duda perdurarán. Amigos míos, un abrazo cariñoso para todos. Algunos partieron al extranjero, otros lo harán pronto. Pero, siempre!, estarán en mi corazón. Gracias por su cariño y eterna paciencia Lore, Carlitos, Koke, Nico, Charlie, Dani y otros cuya identidad no será revelada por asuntos de seguridad nacional. Broma. Gracias por entender este humor infructuoso a ratos y por seguirme siempre la corriente (i).

A mis amigos Guille y Nallatt, me gusta aquello de hablar a veces como si el tiempo nunca hubiera pasado entre reunión y reunión. Y, como si el cariño se mantuviera insensible al paso de éste.

Un abrazo a todos. Gracias, a lo Ceratti, totales!

Esas es mi vida, *boring? may be!*, pero, YO, soy feliz!

Pato Pérez

AGRADECIMIENTOS

A todos quienes formaron parte de este fenomenal proceso de aprendizaje. En esta lista están: Mi profe tutor, Lorena Norambuena, por su apoyo constante. Mi familia, por ser tan geniales conmigo, los amo. A todos los miembros del *Laboratorio de Biología Molecular Vegetal* de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Partiendo por mi co-tutor Michael Handford, por siempre reconcer en este trabajo un arduo esfuerzo. Un agradecimiento especial a mis amigos Carlos Flores, Lorená Pizarro, Carlos Rubilar, Nicolas Manríquez y todos aquellos que constantemente apoyaron el desarrollo de esta tesis con su disposición a compartir sus conocimientos y comentarios. A los amigos *outlab* como Nallat y Guille y no puedo dejar fuera a los amigos del postítulo, Carlos Contreras e Ignacio Carrasco, que me entendieron tantas veces que tenía que entregar un avance o presentar los resultados.

Y, por supuesto, a la persona que me robó el corazón a vista y paciencia mía, sin que siquiera alcanzara a reaccionar ni decir algo, te amo, amor, Carolina Rosas.

Para todos ustedes y todos aquellos que se quedaron fuera por simple Alzheimer, les agradezco de todo corazón. Un abrazo a todos!



Pato Perez

FINANCIAMIENTO



- PROYECTO FONDECYT 11080240

SECRETORY AND ENDOCYTIC SYSTEM IN ARABIDOPSIS THALIANA: CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISM OF SORTIN2, A SYNTHETIC COMPOUND THAT AFFECTS ENDOMEMBRANE SYSTEM.

- INICIATIVA CIENTIFICA MILENIO ICM P06-065-F

NÚCLEO MILENIO DE BIOTECNOLOGÍA CELULAR VEGETAL.

ÍNDICE



AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	V
INDICE DE FIGURAS	VII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
1.1 SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS EN PLANTAS	1
1.2 MOLÉCULAS PEQUEÑAS USADAS EN LA INVESTIGACIÓN DEL TRÁFICO A TRAVÉS DEL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS.....	4
1.3 SORTIN2 Y SUS EFECTOS A NIVEL CELULAR Y FISIOLÓGICO EN <i>A. THALIANA</i>	7
1.4 LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL COMANDA IMPORTANTES CAMBIOS FISIOLÓGICOS EN <i>ARABIDOPSIS</i>	9
1.4.1 <i>Importancia de la auxinas en el desarrollo de Arabidopsis</i>	10
1.4.2 <i>Señalización de la hormona auxina</i>	10
HIPÓTESIS	13
<i>Hipótesis de Trabajo</i>	13
<i>Hipótesis Alternativa</i>	13
OBJETIVOS	13
<i>Objetivo General</i>	13
<i>Objetivos Específicos</i>	13
MÉTODOS	14
2.1 LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	14
2.2 ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS	14
2.3 CULTIVO DE PLANTAS.....	15
2.4 TRATAMIENTOS CON SORTIN2	15
2.5 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS MARCADORES DEL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS	16
2.6 INTERNALIZACIÓN DEL TRAZADOR DE ENDOCITOSIS FM4-64.....	17
2.7 TRATAMIENTO CON DROGAS QUE INTERFIEREN EL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS....	17
2.8 ANÁLISIS DEL FENOTIPO PROVOCADO POR SORTIN2 EN <i>A. THALIANA</i> A NIVEL DE PLANTA COMPLETA.	18
2.9 DEGRADACIÓN DIFERENCIAL DE PIN2 BAJO EL EFECTO DE SORTIN2.....	19
2.10 ANÁLISIS DEL EFECTO DE SORTIN2 SOBRE LA LÍNEA MUTANTE <i>AXR1</i>	19
2.11 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PIN2 BAJO LA ACCIÓN DE SORTIN2. ..	20
2.11.1 <i>Extracción de RNA y generación de cDNA</i>	20
2.11.2 <i>Amplificación de PIN2 por PCR</i>	21
2.11.2 <i>Semicuantificación de los niveles de expresión de PIN2</i>	21
2.12 ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DEL REPRESOR <i>AXR3</i>	21
2.12.1 <i>Análisis de la actividad de GUS</i>	23
2.12.1.A <i>Ensayo histoquímico</i>	24
2.12.1.B <i>Ensayo fluorométrico</i>	24

RESULTADOS	26
3.1 SORTIN2 DESTINA A LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA A VACUOLA.	26
3.2 SORTIN2 ALTERA SELECTIVAMENTE LA LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA.	29
3.2.1 <i>Proteínas de membrana plasmática que reciclan desde los endosomas</i>	29
3.2.2 <i>Proteínas de membrana plasmática que no reciclan desde los endosomas</i> 31	
3.3 SORTIN2 ALTERA LA MORFOLOGÍA DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA RUTA ENDOCÍTICA.....	35
3.4 SORTIN2 NO ALTERA LOS COMPONENTES DE ACTINA NI MICROTÚBULOS DEL CITOESQUELETO.....	38
3.5 SORTIN2 ACELERA LA INTERNALIZACIÓN DEL TRAZADOR DE ENDOCITOSIS FM4-64 ..	42
3.6 EL EFECTO DE SORTIN2 SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE PIN2 ES INDUCIBLE EN TRATAMIENTOS EN MEDIO LÍQUIDO DE CULTIVO (MLC).	44
3.7. SORTIN2 INDUCE LA INTERNALIZACIÓN DE PIN2 HACIA VACUOLA A TRAVÉS DE LA RUTA ENDOCÍTICA.....	45
3.8 EL EFECTO DE SORTIN2 SOBRE LA RUTA ENDOCÍTICA ANTAGONIZA EL EFECTO DE BREFELDINA A.....	47
3.9 SORTIN2 PRODUCE UNA REMOCIÓN DE PROTEÍNA PIN2 DESDE LOS CUERPOS DE BREFELDINA A DESTINÁNDOLA A VACUOLA.	50
3.10 SORTIN2 REQUIERE DE UN COMPARTIMENTO PRE-VACUOLAR Y DE UN CITOESQUELETO DE ACTINA FUNCIONAL	53
3.11 SORTIN2 NO ALTERA LOS NIVELES DE TRANSCRITO DE PIN2	55
3.12 SORTIN2 ALTERA SELECTIVAMENTE LA LOCALIZACIÓN DE PIN1 SEGÚN EL TIPO DE RAÍZ.	58
3.13 SORTIN2 ALTERA PROCESOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON AUXINA.	59
3.14 SORTIN2 INHIBE LA DEGRADACIÓN DIFERENCIAL DE PIN2.....	62
3.15 SORTIN2 NO ALTERA LA SEÑALIZACIÓN DE AUXINA A NIVEL DEL COMPLEJO RECEPTOR DE AUXINA	64
3.16 SORTIN2 NO ALTERA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA AXR3, MIEMBRO DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS REPRESORAS AUX/IAA.....	67
DISCUSIÓN	70
4.1 SORTIN2 ALTERA LA RUTA ENDOCÍTICA DEL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS	70
4.1.1 <i>Internalización del trazador de endocitosis FM4-64</i>	70
4.1.2 <i>Uso del inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida (CHX)</i>	71
4.2 IDENTIFICACIÓN DEL BLANCO CELULAR DE SORTIN2 EN LA RUTA ENDOCÍTICA.....	72
4.2.1 <i>Localización de proteínas marcadoras de la ruta endocítica</i>	72
4.2.2 <i>Drogas que alteran el tráfico de proteínas a través de la ruta endocítica</i>	74
4.3 SORTIN2 NO ALTERA LA MORFOLOGÍA NI FUNCIONALIDAD DEL CITOESQUELETO	76
4.4 CARACTERÍSTICAS, VENTAJAS, E IMPORTANCIA DE SORTIN2.....	78
4.5 SORTIN2 ES DISTINTO DE OTRAS DROGAS USADAS PARA ESTUDIAR EL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS.	79
4.6 SORTIN2 Y EL DESARROLLO DE LA PLANTA.....	80
4.6.1 <i>Desarrollo de plantas mediado por un correcto tráfico vesicular</i>	80
4.6.2 <i>Señalización intracelular de auxina</i>	82
CONCLUSION.....	84
BIBLIOGRAFIA	85



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema de endomembranas.....	3
Figura 2. Estructura química y efectos celulares y fisiológicos de Sortin2.....	8
Figura 3. Esquema simplificado de la señalización intracelular de auxina.....	12
Figura 4. Esquema de la estrategia usada para el análisis de la degradación del represor nuclear AXR3.	23
Figura 5. Sortin2 destina proteínas de membrana plasmática a la vacuola.....	29
Figura 6. Sortin2 es selectivo al alterar proteínas con localización en membrana plasmática.	31
Figura 7. Sortin2 deslocaliza a la proteína de membrana plasmática PIP2A que no presenta reciclaje	32
Figura 8. Sortin2 deslocaliza a la proteína de membrana plasmática PHOT1 que no presentan reciclaje	35
Figura 9. Sortin2 es selectivo al alterar proteínas marcadoras de la ruta endocítica....	37
Figura 10. Sortin2 no altera la funcionalidad del citoesqueleto como sí lo hacen las drogas Oryzalin y Latrunculina B.....	41
Figura 11. La internalización del trazador de endocitosis FM4-64 es acelerada en presencia de Sortin2.....	43
Figura 12. El efecto de Sortin2 es inducible.....	45
Figura 13. El efecto de Sortin2 sobre la localización de PIN2 se produce por la alteración de la ruta endocítica del sistema de endomembranas.....	46
Figura 14. Sortin2 inhibe la acumulación de PIN2 en los cuerpos de BFA antagonizando el efecto de Brefeldina A.....	48
Figura 15. Sortin2 antagoniza el efecto de Brefeldina A alterando específicamente la ruta endocítica.....	50
Figura 16. Sortin2 antagoniza el efecto de Brefeldina A destinando la proteína PIN2 desde los cuerpos de BFA hacia la vacuola.....	52
Figura 17. La destinación de PIN2 hacia la vacuola, por efecto de Sortin2, requiere de que el citoesqueleto y el tráfico entre LE/PVC y vacuola sean funcionales	54
Figura 18. Sortin2 no altera los niveles de expresión de PIN2.....	57

Figura 19. Sortin2 discrimina entre raíz principal y raíz adventicias en términos de la localización de PIN1.....	59
Figura 20. Sortin2 inhibe el crecimiento de la raíz principal y la reorientación gravitrópica.....	61
Figura 21. Sortin2 inhibe la degradación diferencial de PIN2.....	63
Figura 22. La línea knock out axr1-12 es sensible a Sortin2 al igual que la planta Silvestre.....	66
Figura 23. Sortin2 no altera la tasa de degradación del represor de la señalización de auxinas AXR3.....	69
Figura 24. Modelo del blanco celular de Sortin2.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Compuestos químicos de bajo peso molecular usados en la investigación de biología celular de plantas.....6

Tabla II. Líneas de *Arabidopsis thaliana* usadas para los análisis de Sortin2 sobre el sistema de endomembranas y la señalización de auxinas.....14

ABREVIATURAS

BRI1 : Receptor de brasinosteroides

CPY : Carboxipeptidasa Y

DMSO : Dimetilsulfóxido

EDTA : Ácido etilen-diamino-tetra-acético

GFP : Proteína fluorescente verde

GUS : β -glucoronidasa

IAA : ácido 3-indol acético

MS : Medio basal de crecimiento Murashige and Skoog

MU : 4-metil-umbeliferona

MUG : 4-metil-umbeliferil-b-D-galactosa

NAA : ácido 1-naftaleno acético

PAT : Transporte polarizado de Auxinas

SDS : Sodio-dodecilsulfato

SE : Sistema de endomembranas

S2 : Sortin2

X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico

2,4-D : 2,4-diclorofenoxiacético

PIN1, PN2, PIN7: Transportadores de salida (eflujo) de auxina

AUX1: Transportador de entrada (influjo) de auxina

DNA: Acido desoxirribonucleico

RNA : Acido ribonucleico

cDNA : Acido desoxirribonucleico codificante

EE/TGN : Endosoma temprano/Red del trans Golgi

LE/PVC: Endosoma tardío/Compartimento prevacuolar

RE: Endosomas de reciclaje

RESUMEN

El sistema de endomembranas (SE) incluye y funciona en base a la ruta endocítica y secretoria y es fundamental en etapas del desarrollo y la vida de las plantas y animales. A través de ambas rutas se destinan proteínas hacia los distintos compartimentos del SE. Nuevos esfuerzos por entender más acerca del tráfico a través del SE se está haciendo con el uso de pequeñas moléculas inhibitoras o activadoras. Estas moléculas inhiben o activan blanco moleculares específicos con lo cual permiten sobrellevar los problemas de la genética clásica, letalidad y redundancia génica, que se presentan al estudiar el SE. Sortin2 es una de estas moléculas y se ha descrito que produce alteraciones en el SE en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Arabidopsis thaliana*.

En *Arabidopsis*, Sortin2 provoca fenotipos a nivel de planta completa que están relacionados con la respuesta a auxina y que altera la localización de las proteínas transportadoras de auxina, PIN1 y PIN2. El objetivo de este trabajo es la identificación del blanco celular de Sortin2, analizando específicamente qué tráfico vesicular dentro del SE estaría afectando y cómo esta alteración afecta procesos fisiológicos de la planta, que están controlados principalmente, por el transporte hormonal de auxina.

En la presente tesis se profundizó el análisis y se describió que estas proteínas son destinadas, por efecto de Sortin2, al compartimento endocítico llamado vacuola, sin alterar el citoesqueleto celular. Además su efecto es selectivo, ya que altera la localización solamente de ciertas proteínas. Coherentemente, Sortin2 altera la ruta endocítica del SE acelerando la internalización de un marcador general de endocitosis. Y finalmente, mediante dos estrategias diferentes, se observó que el blanco celular de Sortin2 en la ruta endocítica está localizado entre los EE/TGN y los LE/PVC.

Las alteraciones que Sortin2 provoca sobre el SE y en especial sobre los transportadores de auxina tienen importantes consecuencias. Sortin2 inhibe la reorientación gravitrópica, aumenta el número de raíces laterales e inhibe el largo de la raíz principal. Además, parece tener un efecto más severo sobre raíces embrionarias que sobre las no embrionarias siendo coherente con el aumento del número de raíces laterales que provoca. La hormona auxina juega un papel principal en estos procesos fisiológicos. Sin embargo, la señalización intracelular de auxina no es alterada por Sortin2, ni a nivel del receptor SCF^{TIR} ni tampoco a nivel de la degradación de los represores Aux/IAA. Sortin2 es entonces un compuesto químico con un efecto específico sobre el SE lo que genera importantes alteraciones fisiológicas.

Nuestros resultados han mostrado que Sortin2 puede ser una poderosa herramienta para el estudio del SE, distinta de otras drogas usadas clásicamente como Wortmanina, Brefeldina A, Latrunculina B, entre otras. Además, hemos presentado evidencia que su uso en el estudio del SE puede entregar valiosa información acerca fenómenos fisiológicos tan relevantes como el gravitropismo o la generación de raíces laterales

ABSTRACT

The endomembrane system (ES) includes and operates using the endocytic and secretory trafficking pathway and is critical for a correct development and life of plants and animals. Through both trafficking routes proteins are sorted into different compartments of the ES. Further efforts to understand more about the traffic through the ES is being done with the use of small molecule inhibitors or activators. These molecules inhibit or activate specific molecular targets, which is a useful approach to overcome the common problems in classical genetics, lethality and gene redundancy, which are very patented when studying the ES. Sortin2 is one of these molecules and has been reported to cause alterations in the SE in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*.

In *Arabidopsis*, Sortin2 causes whole plant level phenotypes that are related to auxin responsiveness and it also alters the localization of auxin transport proteins, PIN1 and PIN2. The aim of this study is to identify the cellular target of Sortin2, specifically analysing what vesicular trafficking within the ES would be affected and how this change affects plant physiological processes, which are controlled primarily by the transport of the plant hormone called auxin.

In this thesis we went further with the analysis of the effects of Sortin2 and here we describe that Sortin2 induces auxin transporters destination to the endocytic compartment called the vacuole, without altering the cell cytoskeleton. Moreover, its effect is selective, since only changes the location of certain plasma membrane proteins. Consistently, Sortin2 alters the endocytic pathway of the ES since accelerates the internalization of a general marker of endocytosis. And finally, using two different

strategies, we observed that the target cell in the endocytic pathway Sortin2 is located between the EE/TGN and the LE/PVC.

The alterations that Sortin2 causes on the ES and in particular in the auxin transporters localization constitute a very important physiological impact. Prove of that is the fact that Sortin2 inhibits gravitropic reorientation, increases the number of lateral roots and inhibits primary root length. It also seems to have a more severe effect on embryonic roots than non-embryonic root which remain consistent with the increased number of lateral roots upon Sortin2. The hormone auxin plays a major role in these physiological processes. However, Sortin2 at both the SCFTIR receptor level and the degradation of the Aux/IAA repressors does not alter auxin intracellular signalling. Sortin2 is then a chemical compound with a specific effect on the SE, which generates significantly physiological changes.

Our results have shown that Sortin2 can be a powerful tool for studying ES different from other drugs used classically as wortmannin, Brefeldin A, Latrunculin B, among others. We have also presented evidence that using Sortin2 in the study of ES can provide valuable information about physiological phenomena as relevant as gravitropism and lateral root generation.

INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema de endomembranas en plantas

Una parte crucial del funcionamiento celular, como una unidad estructural y funcional de organismos multicelulares, radica en el sistema de endomembranas (SE). Alrededor del 50% de las proteínas de una célula son proteínas que trafican a través del SE. En la Figura 1 se observa un esquema simplificado que indica los componentes y las dos rutas de tráfico, secretoria (rojo) y endocítica (azul), que componen al SE en células vegetales. El tráfico a través del SE se produce en vesículas membranosas que se forman desde un organelo dador y se unen al organelo aceptor sucesivamente hasta llegar a su destino final (Bonifacino y Glick, 2004). Las proteínas que trafican en el SE son sintetizadas en ribosomas unidos a membrana plasmática del retículo endoplasmático (RE, **Figura 1**) y posteriormente son destinadas mediante la ruta secretoria a distintos compartimentos.

La ruta secretoria (**Figura 1**, flechas rojas), considera el tráfico de las proteínas sintetizadas en el RE hacia compartimentos posteriores como el aparato de Golgi (AG), en donde se producen modificaciones post-traduccionales. Algunas proteínas son destinadas posteriormente a membrana plasmática (MP), a través del sistema endosomal, donde algunas pueden actuar como moléculas receptoras de importantes señales para la célula desde su entorno (Geldner y Col., 2007). También pueden formar parte de la pared celular o ser almacenadas o degradadas en vacuola (Surpin y Raikhel, 2004).

El tráfico endocítico (**Figura 1**, flechas azules) permite que ciertos componentes de pared y de MP, sean internalizados y mantenidos en un *pool* intracelular de proteínas en endosomas, que le permiten a la célula reorganizarse rápidamente frente

a ciertos estímulos (Samaj y Col., 2004). Ciertas proteínas en este proceso también pueden ser destinadas a la vacuola para su degradación o almacenaje (Laxmi y Col., 2008).

Al analizar la ruta endocítica del SE (Figura 1), debemos considerar que la endocitosis de las proteínas de membrana plasmática implica el paso por dos compartimentos: 1) Los endosomas tempranos (EE) que en células vegetales corresponde al TGN (*Trans Golgi Network*) y 2) posteriormente los endosomas tardíos (LE), también llamado compartimento pre-vacuolar (PVC). Recientemente, se ha descrito la existencia de un segundo tipo de endosoma temprano (Richter, Voß y Jürgens, 2009), llamados endosomas de reciclaje (RE). Los RE son estructuralmente indistinguibles, en microscopia confocal, de los endosomas tempranos clásicos, pero poseen una funcionalidad distinta (Viotti y Col., 2010). Estos endosomas acumulan proteínas que presentan un ciclaje constitutivo entre membrana plasmática y endosomas (Dhonukshe y Col., 2008a).

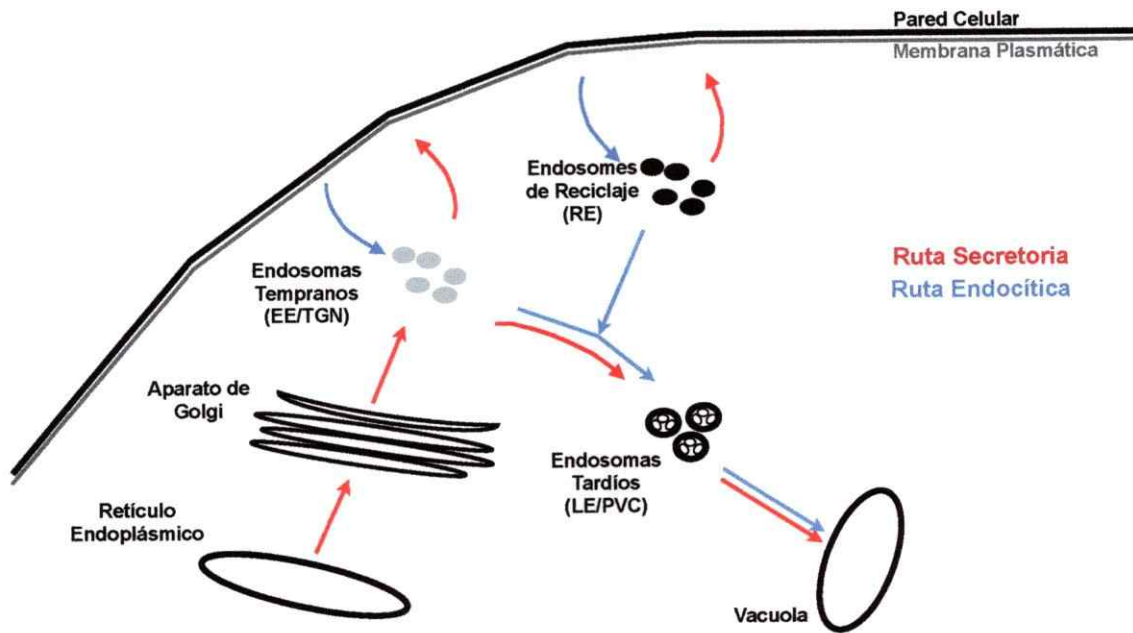


Figura 1. **Esquema del sistema de endomembranas.** El tráfico de proteínas a través del sistema de endomembranas presenta dos rutas principales, secretoria y endocítica. **La ruta secretoria o biosintética** que involucra el transporte de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) hacia compartimentos del sistema de endomembranas como el aparato de Golgi, la vacuola, la membrana plasmática o el exterior de la célula. **La ruta endocítica** involucra el tráfico de proteínas de membrana plasmática o proteínas desde el exterior celular hacia compartimentos intracelulares y eventualmente a la vacuola para su degradación o almacenaje, pasando por compartimentos intermedios como los endosomas tempranos (EE/TGN) y los endosomas tardíos (LE/PVC).

En general, la morfología, localización y funcionamiento de los compartimentos de endomembranas son altamente dinámicos y su regulación es vital para la planta. Esta dinámica del SE está mediada por el citoesqueleto y por lo tanto es un punto importante de regulación del tráfico vesicular a través del SE. Un ejemplo de la importancia del citoesqueleto en el SE, es el movimiento de organelos como los endosomas, ya que ha sido descrito como un movimiento dependiente de actina (Dhonukshe y Col., 2008a).

En los últimos años se le ha adjudicado al sistema de endomembranas (SE) una importante participación en procesos fisiológicos como el desarrollo de la planta, los tropismos y hasta mecanismos de defensa al ataque de patógenos (Surpin y

Raikhel, 2004). La hormona auxina ha sido identificada como uno de los principales factores involucrados en el control de los procesos mencionados (Taiz y Zeiger, 2010). Se ha descrito una directa relación de la señalización de la hormona auxina, con la ruta endocítica. Esta relación se explicaría principalmente por el papel que cumple el SE en el transporte polar célula a célula de la auxina. Este transporte de la auxina basa su funcionamiento en la localización polar de los facilitadores del transporte de auxina, los que son destinadas de manera no polarizada a la membrana plasmática por la ruta secretoria y posteriormente, mediante endocitosis, se establece su localización polarizada (Dhonukshe y Col., 2008b; Geldner y Col., 2001).

1.2 Moléculas pequeñas usadas en la investigación del tráfico a través del sistema de endomembranas

Para el estudio del tráfico a través del sistema de endomembranas se deben sobrellevar al menos dos problemas: 1) la redundancia génica y 2) los problemas de letalidad de las mutantes en genes cuyos productos son importantes para el establecimiento del sistema. La investigación en base a la genética clásica no puede lidiar con estos problemas en el estudio del SE. Esto se ha intentado resolver a través del uso de pequeñas moléculas, agonistas o inhibidores biológicos, cuya acción permita estudiar al SE, sin las complicaciones antes mencionadas (Kaschani y van der Hoorn, 2007). El uso de estas pequeñas moléculas ayudarían a dilucidar la interacción de complejas redes celulares (Hicks y Raikhel, 2009) y constituyen una poderosa herramienta de precisión en la investigación en biología celular de plantas (Raikhel y Pirrung, 2005).

En la Tabla I se resumen algunos de los compuestos químicos actualmente usados en la investigación en tráfico a través de SE. Existe una alta variedad en el tipo de mecanismo por el cuál estas drogas producen finalmente una alteración en el tráfico

a través del SE. Algunas drogas inhiben la fosforilación de proteínas, otras inhiben procesos de degradación proteica, otras alteran el citoesqueleto (Latrunculina B y Colchicina) y otras actúan sobre componentes moleculares que asisten la formación de las vesículas que trafican a través del SE. Sin embargo, a pesar de la variedad existente, hay una constante búsqueda de nuevos miembros de esta caja de herramientas para la investigación celular, ya que los esfuerzos aún son insuficientes para dilucidar completamente la compleja red de interacciones que subyace al SE (Raikhel y Pirrung, 2005).

Las actividades específicas para estas moléculas (Tabla I) está, en la mayoría de los casos, altamente estudiada y específicamente identificada. Brefeldina A (BFA), por ejemplo, altera el reciclaje constitutivo de proteínas de membranas plasmática. El tráfico desde endosomas a membrana plasmática es sensible a esta droga, ya que BFA inhibe la acción de una proteína llamada GNOM que es crucial para la formación de las vesículas mediando el reclutamiento de proteínas accesorias de cubierta (Geldner y Col., 2001). Otra droga ampliamente usada en biología celular es MG132 (Tabla I) que inhibe la actividad del proteosoma y, por lo tanto, la degradación de proteínas ubiquitinadas (Hayashi y Col., 2009).

Tabla I. Compuestos químicos de bajo peso molecular usados en la investigación de biología celular de plantas

Nombre del Compuesto	PM (Da)	Función/Blanco
<i>Moduladores de la fosforilación</i>		
Wortmanina	428	Inhibidor de fosfoinositol 3-quinasa (PI3-K)
Cantaridina	168	Inhibidor de fosfatasa
<i>Moduladores de la proteólisis</i>		
MG132	475	Inhibidor de síntesis de proteínas
Bestatina	308	Inhibidor de aminopeptidasa
<i>Moduladores del tráfico de membranas</i>		
Latrunculin B	395	Inhibidor de polimerización de actina
Brefeldina A	280	Inhibidor de tráfico vesicular
Colchicina	399	Inhibidor de ensamblaje de proteínas
Monesina	667	Inhibidor de transporte intracelular de proteínas
Oryzalin	346	Inhibidor de polimerización de tubulina
<i>Otros</i>		
Tunicamicina	830	Inhibidor N-acetilglucosamina transferasas
Cicloheximida	281	Inhibidor de síntesis de proteínas
Bafilomicina	622	Inhibidor de protón-ATPasa vacuolar
Quinidina	326	Inhibidor de la exudación de raíz

En la identificación de este tipo de moléculas, la genómica química está adquiriendo un papel cada vez más importante (Carter, Bednarek y Raikhel, 2004; Robert y Col., 2008). Esta nueva estrategia contempla el uso de librerías químicas de compuestos sintéticos de diversa naturaleza estructural. Aquellas que generen un fenotipo particular, en un determinado sistema biológico, son seleccionadas como candidatas a formar parte de las herramientas de investigación en biología vegetal. Mediante esta estrategia se han identificado compuestos como la droga Endosidina1 (Robert y Col., 2008), cuyo blanco celular es el tráfico. Pero, otros compuestos químicos, también identificados por genómica química, como el compuesto Sortins (Zouhar, Hicks y Raikhel, 2004), aún no poseen un blanco celular ni molecular conocido. Las ventajas del uso de estas nuevas moléculas para resolver problemas biológicos, se refuerzan, con una detallada caracterización de sus efectos en busca de la identificación de su blanco.

1.3 Sortin2 y sus efectos a nivel celular y fisiológico en *A. thaliana*

Sortin2 es un compuesto químico sintético de baja masa molecular identificado usando una librería química de cerca de 4.800 miembros. Se buscó aquellos que causaran la secreción hacia el medio extracelular en levaduras de la proteína carboxipeptidasa (CPY), localizada en la vacuola. Catorce compuestos resultaron ser activos bajo este criterio. Aquellos que son además, bioactivos en *A. thaliana* se les denominó Sortin (*Sorting inhibitors*) (Zouhar, Hicks y Raikhel, 2004). Sortin2 es uno de estos compuestos bioactivos en levaduras y en la planta *Arabidopsis thaliana*.

El SE de *Arabidopsis* es alterado por Sortin2, ya que la proteína CPY, al igual que en levaduras, es destinada incorrectamente al medio extracelular en tratamientos con el compuesto químico (**Figura 2A**, Norambuena y Col., resultados no publicados). Por otro lado, Sortin2 afecta notoriamente la localización de los componentes moleculares del transporte de auxina, las proteínas PIN, en células vegetales. Esto evidencia la transversalidad del efecto de Sortin2 entre sistemas biológicos, como levaduras y plantas, cuyo SE es altamente conservado. En mi seminario de título se estableció que Sortin2 induce la acumulación de proteínas PIN1 y PIN2 en compartimentos intracelulares de gran tamaño que tienen morfología de vacuola (**Figura 2B**, Pérez, 2009).

Coherente con alteraciones en el sistema de transporte de auxina, Sortin2 induce un marcado efecto a nivel fisiológico. Plántulas de *Arabidopsis* germinadas en presencia de Sortin2 (**Figura 2C**) presentan fenotipos característicos como: 1) inhibición del crecimiento de la raíz 2) alteración de la orientación gravitrópica. Ambos fenotipos alterados son procesos fisiológicos que están gobernados por la señalización de la hormona auxina. Eso sugiere que los efectos a nivel de toda la planta podría ser

una consecuencia de la alteración en la localización de los transportadores PIN de la hormona auxina.

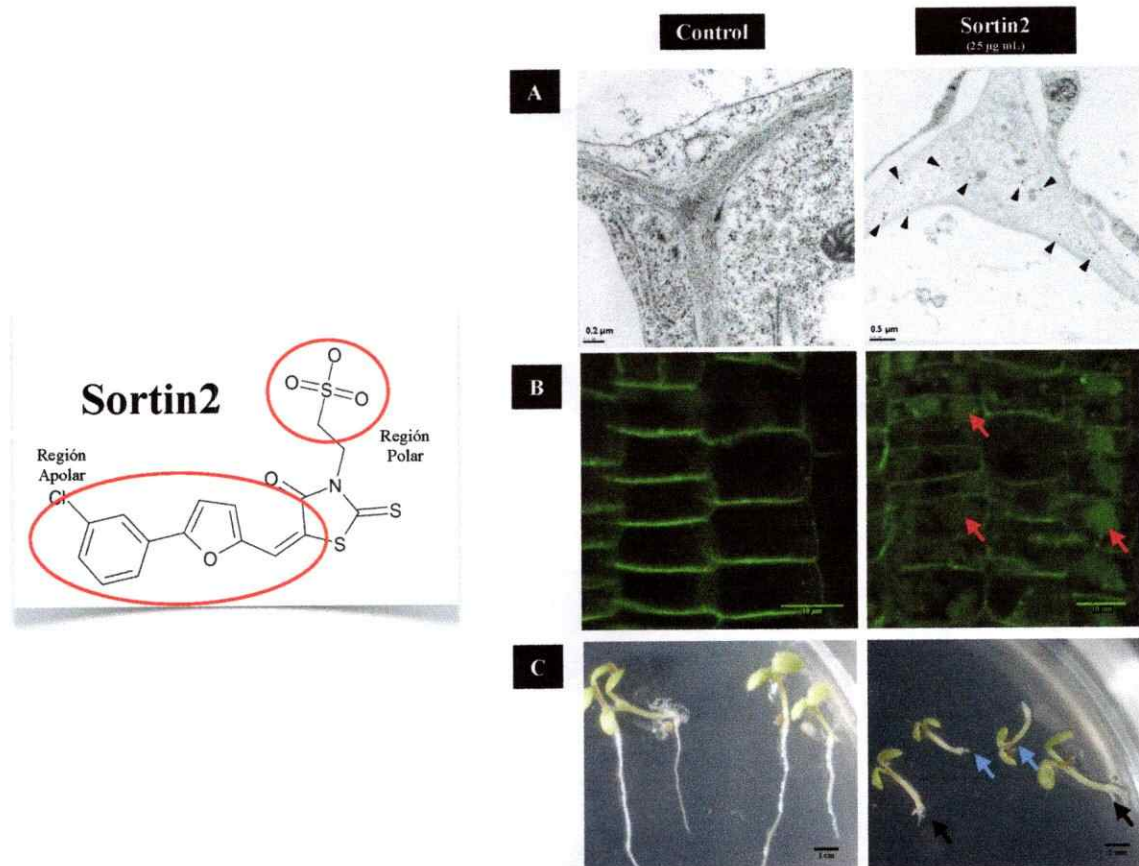


Figura 2. Estructura química y efectos celulares y fisiológicos de Sortin2. (A) Inmunomicroscopía electrónica de células de hipocótilo de *Arabidopsis thaliana*. La inmunolocalización con partículas de oro permite observar a la proteína CPY (flechas negras) en el espacio extracelular en plantas tratadas con Sortin2 a diferencia de lo que se observa en condiciones control (Norambuena y Col., resultados no publicados) (B) Microscopía confocal de células de la punta de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. La proteína PIN2:GFP se acumula en cuerpos intracelulares de gran tamaño (flechas rojas) en células de plantas tratadas con Sortin2 (Pérez, 2009). (C) Análisis fenotípico de plántulas de *Arabidopsis thaliana* que han sido germinadas en Sortin2. Las plántulas crecidas en presencia de Sortin2 muestran un reducido tamaño. Es evidente además la aparición de raíces adventicias, raíces laterales que se originan desde el hipocótilo, en plantas tratadas con Sortin2 (flechas negras). Además, las plantas muestran una pérdida de orientación gravitrópica (flechas azules) (Pérez, 2009).

Existen otros procesos fisiológicos de la planta que están relacionados con un correcto funcionamiento del SE, que también son alterados por Sortin2. Análisis realizados en *Arabidopsis* y *Nicotiana tabacum* (tabaco), demuestran que Sortin2 inhibe la germinación del polen y altera la polaridad de la elongación del tubo polínico (Norambuena y Col., resultados no publicados). Ambos fenotipos están fuertemente ligados a una destinación de componentes celulares hacia determinadas zonas de la célula a través del SE.

Sortin2 presenta una interesante relación entre sus efectos fisiológicos, el transporte polarizado de las auxinas y además el tráfico vesicular en el SE. La hormona auxina es crucial para el desarrollo de la planta, ejerciendo su efecto principalmente a través de un correcto flujo por sus tejidos (ver sección 1.4.1). Por otro lado, la adecuada localización celular de los transportadores de auxina es fundamental para este correcto flujo y, como se ha señalado antes, esta localización, está mediada por un adecuado tráfico vesicular. Estos antecedentes posicionan a Sortin2 como un compuesto muy interesante de estudiar.

1.4 La señalización hormonal comanda importantes cambios fisiológicos en *Arabidopsis*

Los animales a lo largo de la evolución han adquirido elaboradas capacidades sensoriales y de locomoción, mientras que las plantas han evolucionado hacia la tolerancia fisiológica y una mayor plasticidad fenotípica. La flexibilidad fenotípica de las plantas es una consecuencia de apropiados cambios fisiológicos. Muchos de estos procesos se encuentran regulados por moléculas señalizadoras llamadas hormonas. Dentro de las primeras hormonas caracterizadas y más estudiadas encontramos a la auxina.

1.4.1 Importancia de la auxinas en el desarrollo de Arabidopsis

Las auxinas juegan un rol primordial en muchos procesos fisiológicos en plantas como la polaridad, el desarrollo embrionario y del fruto, organogénesis, diferenciación tisular vascular, tropismo, formación del gancho del hipocótilo y dominancia apical (Paciorek y Frimi, 2006; Rashotte y Col, 2000). En general, las auxinas como IAA ó IBA, han sido implicadas en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas.

Para promover cambios durante el desarrollo, la hormona vegetal auxina provoca una referencia espacial y temporal, mediante su acumulación local en determinadas células (Frimi y Col., 2003).

1.4.2 Señalización de la hormona auxina

El primer paso requerido para la señalización de auxina es el transporte de esta hormona hasta las zonas de acumulación. El movimiento de esta hormona en la planta se produce a través del sistema vascular y del transporte polarizado de célula a célula (PAT, del inglés *Polar Auxin Transport*). Sin embargo, este último mecanismo es el más importante para los efectos que la auxina produce (Taiz y Zeiger, 2006).

El segundo paso en la señalización de las auxinas, luego de su transporte, corresponde a la señalización intracelular. Esto requiere de un receptor de la hormona. A la fecha, se han descrito al menos dos mecanismos por los cuales las auxinas serían sensadas; las proteínas ABP1 (*auxin binding protein 1*) y TIR1 (*transport inhibitor response1*). Se conoce mucho acerca de la estructura e incluso del mecanismo molecular de unión a auxina de la proteína de unión a auxina, ABP1 (Henderson y Col., 1997). Sin embargo, la vía de señalización de auxina más convencional y mas extensamente caracterizada usa el receptor TIR1 es (Mockaitis y Estelle, 2008; Taiz y Zeiger, 2010)

El modelo actual de la señalización de auxinas sugiere (Mockaitis y Estelle, 2008) que la hormona auxina ingresa a la célula y luego interactúa con el complejo nuclear, formado por TIR1 y proteínas accesorias, SCF^{TIR} (Figura 3). El receptor SCF^{TIR} unido a auxina, actúa como una enzima E3 ubiquitina ligasa marcando a las proteínas Aux/IAA (auxina/acido 3-indol acético), para su degradación mediada por el proteosoma. La degradación de las proteínas Aux/IAA impide la formación de heterodímeros con los factores de transcripción ARF (Auxin Response Factors). Los factores ARF liberados de la regulación negativa por Aux/IAA comandan la expresión de una red de genes que responden a auxina, guiando así, un apropiado desarrollo y crecimiento de la planta (Zhao y Col., 2003).

Sortin2 provoca fenotipos relacionados con la función fisiológica de auxina que podrían estar explicados por el efecto que tiene Sortin2 sobre el SE. Sin embargo, existen otras drogas que provocan este tipo de fenotipos, alterando directamente los mecanismos moleculares de transducción de la señal intracelular de auxina. Toyocamicina y Yokonolide B, por ejemplo, son drogas que estabilizan a los represores Aux/IAA (Hayashi y Col., 2003; Hayashi y Col., 2009). Por lo tanto, una segunda explicación de los efectos fenotípicos que se observa en las plantas tratadas con Sortin2, sería que Sortin2 actúa como un estabilizador de las proteínas Aux/IAA, alterando la señalización intracelular de auxina.

Dado los efectos que Sortin2 provoca en Arabidopsis debemos, entonces, evaluar el efecto del compuesto químico tanto sobre el sistema de endomembranas y su funcionalidad, como también, en la señalización intracelular de la hormona auxina. El análisis de Sortin2 en la señalización intracelular de esta hormona requiere considerar al menos en dos puntos claves, la funcionalidad del complejo receptor de auxina y la estabilidad de las proteínas Aux/IAA.

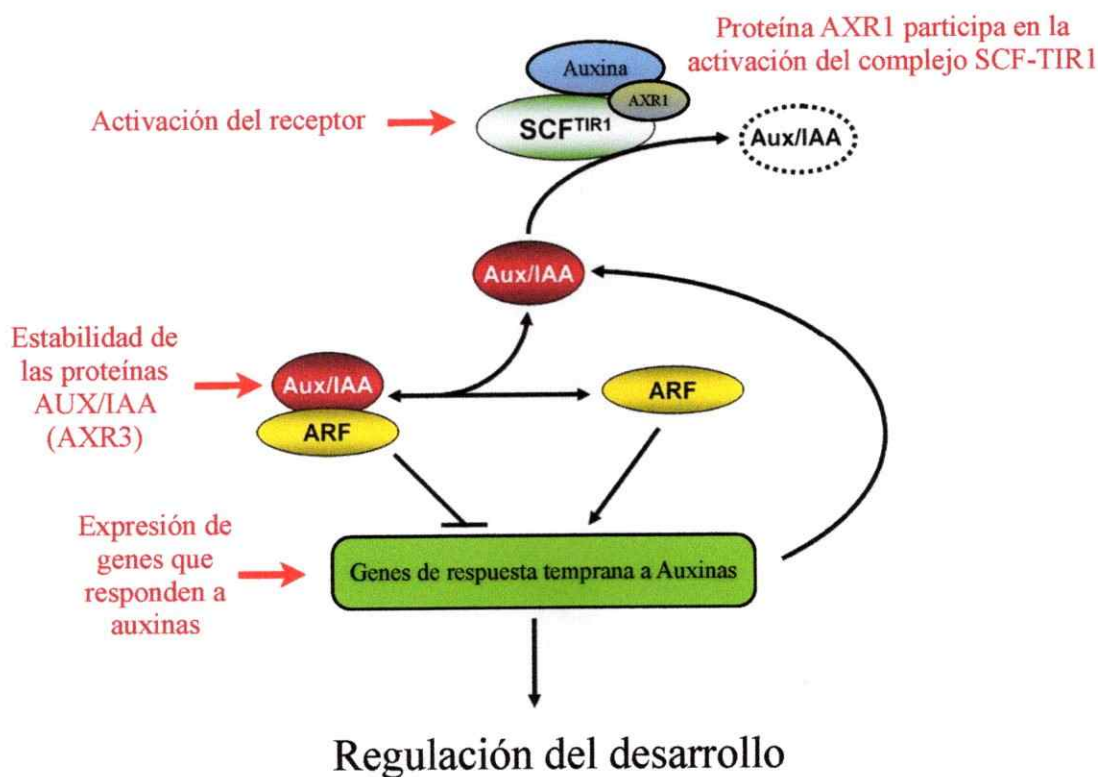


Figura 3. **Esquema simplificado de la señalización intracelular de auxina.** La señalización intracelular de auxina es mediada por proteínas ARF y Aux/IAA. Las proteínas Aux/IAA forman un complejo que impide a las proteínas ARF (factores de transcripción) activar genes de respuesta a auxina. Cuando la auxina ingresa a la célula, e interactúa, en el núcleo, con varias proteínas formando el complejo SCF^{TIR}. El complejo SCF^{TIR} actúa como una E3 ubiquitina ligasa, promoviendo la degradación de los represores Aux/IAA vía el proteosoma (Taiz y Zeiger, 2010).

HIPOTESIS

Hipótesis de Trabajo

Sortin2 afecta mecanismos endocíticos, causando una deslocalización de los transportadores de auxina, provocando alteraciones fisiológicas en *Arabidopsis thaliana*.

Hipótesis Alternativa

Sortin2 no afecta mecanismos endocíticos, sino que afecta la vía de señalización de auxina a nivel del receptor ó de proteínas represoras Aux/IAA, causando alteraciones fisiológicas en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar los efectos de Sortin2 sobre el sistema de endomembranas y la destinación polar de las proteínas facilitadores de auxina y las consecuencias sobre la vía de señalización de auxina.

Objetivos Específicos

1. Identificar el efecto de Sortin2 en el funcionamiento del sistema de endomembranas.
2. Identificar a qué nivel del tráfico vesicular del sistema de endomembranas actúa Sortin2.
3. Identificar la relación entre el efecto de Sortin2 a nivel celular en la localización de las proteínas PIN con la pérdida de una apropiada respuesta fisiológica en plántulas graviestimuladas en *Arabidopsis thaliana*.
4. Evaluar el efecto de Sortin2 sobre la vía de señalización de auxinas.

MÉTODOS

2.1 Líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana fue el modelo biológico de estudio para todos los experimentos realizados en esta tesis. Las ventajas de usar esta planta como modelo han sido ampliamente discutidas en la literatura científica (Leonelli, 2007). En este trabajo se usaron líneas transgénicas (Tabla II) de *Arabidopsis thaliana* que fueron facilitadas por los respectivos laboratorios en donde se generaron y forman parte del banco de semillas del laboratorio de la Dr. Lorena Norambuena. Para los estudios de Sortin2 sobre la señalización de auxinas se usaron las líneas HS:AXR3NT:GUS y *axr1-12* facilitadas por el laboratorio de Dr. Mark Estelle, Universidad de California, San Diego, EE.UU. Todas las otras líneas transgénicas que la **Tabla II** enumera fueron usadas en los análisis de localización de marcadores celulares.

Tabla III. Líneas de *Arabidopsis thaliana* usadas para los análisis de Sortin2 sobre el sistema de endomembranas y la señalización de auxinas.

Nombre de la línea	Localización subcelular*	Referencia
ARA6:GFP	Endosomas	Grebe y col., 2003
ARA7:GFP	LE/PVC	Jaillais y col., 2006
SYP22:YFP	LE/PVC y Tonoplasto	Robert y col., 2008
PIP2A:GFP	MP	Tian y col., 2004
PHOT1:YFP	MP	Sakamoto y Briggs, 2004
ABD2:GFP	Citoesqueleto de Actina	Wang y col., 2004
BRI1:GFP	MP/RE	Russinova y col., 2004
PIN2:GFP	MP/RE	Xu y Scheres, 2005
PIN1:GFP	MP/RE	Benkiva y col., 2003
PIN7:GFP	MP/RE	Blakeslee y col., 2007
AUX1:YFP	MP/RE	Kleine-Vhen y col., 2006
AXR3NT:GUS	-	Grey y col., 2001
<i>axr1-12</i>	-	Lincoln y col., 1990

*Endosomas de reciclaje (RE), Membrana plasmática (MP).

2.2 Esterilización de semillas

Las semillas de todas las líneas usadas fueron esterilizadas mediante un protocolo estándar que consiste en los siguientes pasos: 1) lavar entre 300 – 600

semillas con 1 mL de etanol 95% v/v (calidad analítica) durante 5 minutos en agitación moderada. 2) luego incubar las semillas con 1 mL de solución etanol 70% v/v TX100 0,1% v/v por 15 minutos en agitación moderada. 3) lavar con 1mL de agua estéril 5 veces, agitando brevemente entre cada lavado 4) incubar las semillas en 1 mL de agua estéril a 4°C en oscuridad durante al menos 48 horas antes de usar. Este último paso, llamado estratificación en frío, permite sincronizar la germinación de las semillas.

2.3 Cultivo de plantas

Las semillas de las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la sección 2.1 fueron germinadas y crecidas en placas de cultivo. Las placas se dispusieron verticalmente para que las plántulas crecieran en la superficie del Medio Sólido de Cultivo (MSC) de plantas (MS 0,44% m/v [Phyto Technology Laboratories #M519], sacarosa 2% m/v, fitoagar 0,7% m/v, 0,01% mioinositol m/v, MES 0,05% m/v, pH 5.7). Todas las plántulas fueron cultivadas en condiciones estándares de crecimiento a 22°C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con una intensidad luminosa de 6.000 lux.

El crecimiento de las plantas en placas de disposición vertical es altamente recomendado cuando las plántulas van a ser manipuladas para realizar tratamientos, ya que permite traspasar la plántula de un medio a otro provocando un menor deterioro.

2.4 Tratamientos con Sortin2

Los tratamientos con Sortin2 se realizaron a concentraciones de 25 ó 50 µg/mL diluyendo una solución stock de 20 mg/mL en Medio Sólido de Cultivo ó Medio Líquido de Cultivo (MLC) según fuese necesario. El MLC contiene lo mismo que el MSC a excepción de agar. La condición control, para los análisis de los efectos de Sortin2, fue MSC o MLC de plantas conteniendo DMSO 1%. Esta concentración final 1% v/v de

DMSO no afecta el desarrollo de las plantas (Zohuar y col, 2004). Por último, todas las soluciones con Sortin2 fueron incubadas durante 96 horas en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad, con intensidad luminosa de 6.000 lux).

2.5 Análisis de la localización subcelular de los marcadores del sistema de endomembranas

El análisis de la localización subcelular de los marcadores detallados en la tabla II se realizó mediante microscopía confocal. Se comparó la ubicación de los marcadores en plántulas que fueron sometidas a tratamientos con Sortin2 con aquellas que recibieron tratamiento control.

Las observaciones se realizaron en las zonas meristemáticas y de elongación de la punta de la raíz de las plántulas, a excepción del marcador PHOT1:GFP que se observó en células del hipocótilo. Cada marcador fue analizado en el tipo celular en el que se ha descrito su localización (Revisado en Kleine-Vehn y Friml, 2008). PIN1 se localiza en el tejido vascular, PIN2 en epidermis y corteza, PIN7 en columela y los otros marcadores en todos los tejidos de la punta de la raíz.

Los tratamientos utilizados fueron:

1. *Plántulas germinadas en las placas de tratamientos.* Semillas de las líneas marcadoras fueron sembradas en placas de tratamiento de Sortin2.

2. *Plántulas de 7 días trasladadas a placas de tratamiento.* Plántulas de 7 días de las líneas marcadoras fueron trasladadas desde el MSC en el que crecieron hasta las placas de tratamiento preparadas según lo descrito en la sección 2.3.

Se usó el microscopio confocal Zeiss LSM 510 y Olympus FV1000. Se usó los láseres de excitación 488 y 514 nm, para GFP e YFP, respectivamente. Se capturó la fluorescencia de la proteína GFP en el rango 505-530 nm, mientras que para YFP se usó el filtro 530-600. El análisis de las imágenes se realizó con los programas Macnification 1.5.1 (Orbicule® 2008) e Imagej 1.40 (Wayne Rasband, NIH, USA).

2.6 Internalización del trazador de endocitosis FM4-64

Plántulas silvestre del ecotipo Col-0 fueron incubadas en FM4-64 5 μM en MLC durante 10 minutos a 4° C en oscuridad. A esta temperatura se inhibe la endocitosis y el marcador solo se acumula en los límites celulares sin ingresar a las células. Luego se incubó a temperatura ambiente (~22° C) en MLC. Se observó la localización de FM4-64 a los tiempos de 0, 60 y 120 minutos de incubación a temperatura ambiente, mediante microscopía confocal. La localización de la tinción se visualizó usando el microscopio confocal Zeiss LSM 510 al excitar a 514 nm, recogiendo la emisión usando el filtro LP560 (Bolte y col, 2004).

2.7 Tratamiento con drogas que interfieren el sistema de endomembranas

Los plántulas de 7 días fueron incubadas en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos conteniendo Medio líquido de cultivo (MSL) con las distintas drogas. Para evaluar el efecto de Sortin2 sobre el citoesqueleto se usaron drogas ampliamente usadas en estos análisis como lo son Latrunculina B y Oryzalin (Geldner y Col., 2001). Latrunculina B es un compuesto químico que une actina G y por lo tanto impide la unión de los monómeros de actina al filamento causando su depolimerización. La droga Oryzalin, depolimeriza microtúbulos, el segundo componente importante del citoesqueleto. Las concentraciones de droga utilizadas fueron las recomendadas en la literatura, Latrunculina B 20 μM (stock de 20 mM) y Oryzalin 10 μM (stock de 100 mM) (Kleine-Vehn y Col., 2008).

Para aislar el componente secretorio del endocítico, se usó la droga Cicloheximida (50 μM , stock de 50 mM) que actúa como un inhibidor de la síntesis de proteína, ya que inhibe a la enzima peptidil transferasa en el ribosoma generando una inhibición de la elongación traduccional. Esto permitió visualizar mediante microscopía

confocal la acumulación de proteína proveniente exclusivamente a través de la ruta endocítica.

Para analizar el efecto de Sortin2 sobre el primer paso de la endocitosis que corresponde a la internalización desde la membrana plasmática, se usó la droga BFA (50 μ M, stock de 5 mg/mL) que actúa como inhibidor del tráfico desde endosomas a membrana plasmática.

Para analizar el tráfico del transportador de auxina PIN2 hacia la vacuola se usó la droga Wortmanina (15 μ M, stock de 30 mM) que corresponde a un inhibidor de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). En plantas, se ha descrito como un inhibidor del tráfico vesicular desde el compartimento pre-vacuolar (PVC) hacia la vacuola.

2.8 Análisis del fenotipo provocado por Sortin2 en *A. thaliana* a nivel de planta completa.

Para comprobar que las alteraciones que produce Sortin2 en el fenotipo de *Arabidopsis* son independientes de un posible efecto en el desarrollo embrional de la planta, se evaluó su efecto sobre plántulas de 7 días. Se consideraron los efectos de Sortin2 en términos de la inhibición del crecimiento de la raíz principal y de la alteración de la respuesta gravitrópica. Para evaluar lo anterior, se obtuvieron plántulas de 7 días de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 en condiciones de cultivo. Luego, las plántulas obtenidas fueron trasladadas a MSC conteniendo Sortin2 a distintas concentraciones (25 y 50 μ g/mL) y dispuestas durante 4 días a las mismas condiciones que antes del traslado a las placas de tratamiento. Para el análisis de reorientación gravitrópica, las placas de tratamiento se dispusieron en 90° con respecto al vector de gravedad. Las plántulas fueron fotografiadas a los 4 días de tratamiento, usando una cámara fotográfica FUJIFILM FINEPIX S1500 en modo Super Macro. Las imágenes fueron luego procesadas con el programa computacional Macnification 1.5.1 (Orbicule® 2008) para medir el largo de la raíz y con Keynote® para medir el ángulo de la curvatura de la

raíz como respuesta gravitrópica. Para el tratamiento de datos se usaron los programas computacionales Microsoft Excel® y R Statistics®.

2.9 Degradación diferencial de PIN2 bajo el efecto de Sortin2

Para la evaluación del efecto de Sortin2 en la degradación diferencial del transportador PIN2 en las caras superior e inferior de la punta de la raíz, se determinó la cantidad de proteína PIN2 acumulada mediante microscopía, posterior a un tratamiento de reorientación gravitrópica en oscuridad. Para esto, se emplearon plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP crecidas verticalmente en MSC durante 7 días. Luego, las plántulas fueron trasladadas a las placas de tratamiento que son descritas en la sección 2.4. Las placas fueron envueltas en papel aislante de la luz y al mismo tiempo dispuestas en 90° con respecto al vector de gravedad durante 3 horas. Al término del tratamiento se observaron con microscopía confocal, considerando que las bases teórico-ópticas del microscopio indican que se genera una inversión de la imagen.

2.10 Análisis del efecto de Sortin2 sobre la línea mutante *axr1*.

Para analizar si la ausencia del producto génico en la línea *axr1-12* otorga resistencia al efecto del químico Sortin2, se compararon los efectos de éste en la planta mutante con respecto a la silvestre. Los rasgos seleccionados para la comparación son el largo de la raíz principal, el largo y el número de raíces laterales, luego de cuatro días de tratamiento con Sortin2.

Se realiza el mismo procedimiento que en la sección 2.8, con excepción que para el análisis de *axr1-12* versus silvestre, la cuantificación de los rasgos seleccionados están hechos sobre las plantas estimuladas gravitrópicamente.

2.11 Análisis de los niveles de expresión de PIN2 bajo la acción de Sortin2.

Para descartar que la destinación de PIN2 a vacuola provocada por Sortin2 es consecuencia de una regulación transcripcional de PIN2, se analizó los niveles de transcrito de PIN2 en distintos tiempos de tratamiento con Sortin2. Para esto, se recolectaron aproximadamente 15 plántulas (25 mg) silvestres ecotipo Col-0 crecidas en MSC durante 7 días. Las plántulas recolectadas fueron dispuestas en MLC conteniendo DMSO 1% (control) ó Sortin2 50 µg/mL durante 0, 2, 4 y 6 horas. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

2.11.1 Extracción de RNA y generación de cDNA

Se extrajo RNA de cada muestra con el kit Promega® siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El último paso del protocolo de extracción de RNA considera una eliminación de contaminación por DNA realizando un tratamiento con DNAasa. Se cuantificó el RNA total, usando espectrofotometría ($\lambda = 260$ nm) utilizando un Nanodrop 1000 ThermoScientific™. Se evaluó además la calidad del RNA con los parámetros 260/280 y 260/230 entregados por el Nanodrop. La razón 260 nm/280 nm entre los valores 1.8 y 2.0 da cuenta de extracciones sin contaminantes de proteínas o fenoles. Se acepta que la razón 260 nm /230 nm esté entre 1,8 y 2,2 indicando que no hay presencia de solventes orgánicos ó sales que absorben a 230 nm. La integridad del RNA se evaluó cargando la muestra en un gel de electroforesis de agarosa al 1,5% (m/v).

Para sintetizar cDNA se mezcló 1 µg de RNA total con 1 µL de oligo AP y se realizó la reacción de retrotranscripción en un volumen final de 20 µL (buffer de reacción 1X, 1 µL ImPronII™, dNTPs 0,25 mM, 3 mM de MgCl₂, Inhibidor de RNAsa RiboLock™ 2u/µL). Se verificó la calidad del cDNA amplificado el gen de actina usando

los siguientes partidores: (Actina-f) 5' GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT 3' y (Actina-r) 5' CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT 3.

2.11.2 Amplificación de PIN2 por PCR

Para la amplificación por PCR de PIN2 se generaron partidores con el programa Primer3 disponible en línea (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Se usó la secuencia de la región codificante del gen At5g57090 según la base de datos The Arabidopsis Information Resource (TAIR). La región amplificada por los partidores (PIN2-f) 5' CTGGTCCAGGTGGAGATGTT 3' y (PIN2-r) 5' TCAAGAACCTTACGGCCATC 3' corresponde a un fragmento de 855 pb. Para normalizar la expresión del gen PIN2 se usó la amplificación del gen constitutivo actina. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador BIORAD™ con el siguiente protocolo: Primer paso: 5 min de denaturación inicial. Segundo Paso: 60s a 90 °C (Denaturación), 60s a 55 °C (Unión del partidor), 120s a 72 °C (Extensión). Este paso se repitió 32 veces (32 ciclos). Tercer paso: 10 min para una elongación final.

2.11.2 Semicuantificación de los niveles de expresión de PIN2

Para asegurarse de que la cantidad de producto de PCR está en una relación lineal con la cantidad de templado disponible inicialmente se debe realizar una estandarización del número de ciclos usados en el protocolo de amplificación. La estandarización del número de ciclos de la reacción de PCR se realizó considerando el rango 21-33 ciclos para la amplificación del gen de actina y 26-38 para la amplificación del gen PIN2.

2.12 Análisis de la degradación del represor AXR3.

Para evaluar si el efecto de Sortin2 es sobre la señalización intracelular de auxina se estudió el efecto del químico en la estabilidad de las proteínas represoras

AXR3 (Hayashi y Col., 2003, Gray y Col., 2001). Para esto se usó la línea transgénica HS::AXR3NT:GUS que posee al gen de AXR3 fusionado a la proteína reportera GUS y antecedido por el promotor inducible por temperatura, *Heat Shock promoter* (HS) (Figura 4).

El análisis se realizó adaptando el procedimiento descrito en Gray y col., 2001. Plántulas de 7 días (n=15) de la línea transgénica fueron incubadas en MSL durante 2 horas a 37 °C para inducir la expresión del transgen. Luego de la inducción se les incubó a 22 °C durante 20 minutos para posteriormente trasladar las plántulas a MSL conteniendo DMSO 1%, auxina NAA (ácido naftalacetico) 10 μ M ó Sortin2 50 μ g/mL. Se tomaron muestras a los 20, 40, 60 y 80 minutos después de la inducción por temperatura. Se detuvo la degradación proteica sumergiendo el set de plántulas durante 20 segundos en acetona 70% enfriada a -20 °C. Posteriormente, las plántulas fueron lavadas en agua, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a - 80 °C hasta su uso.

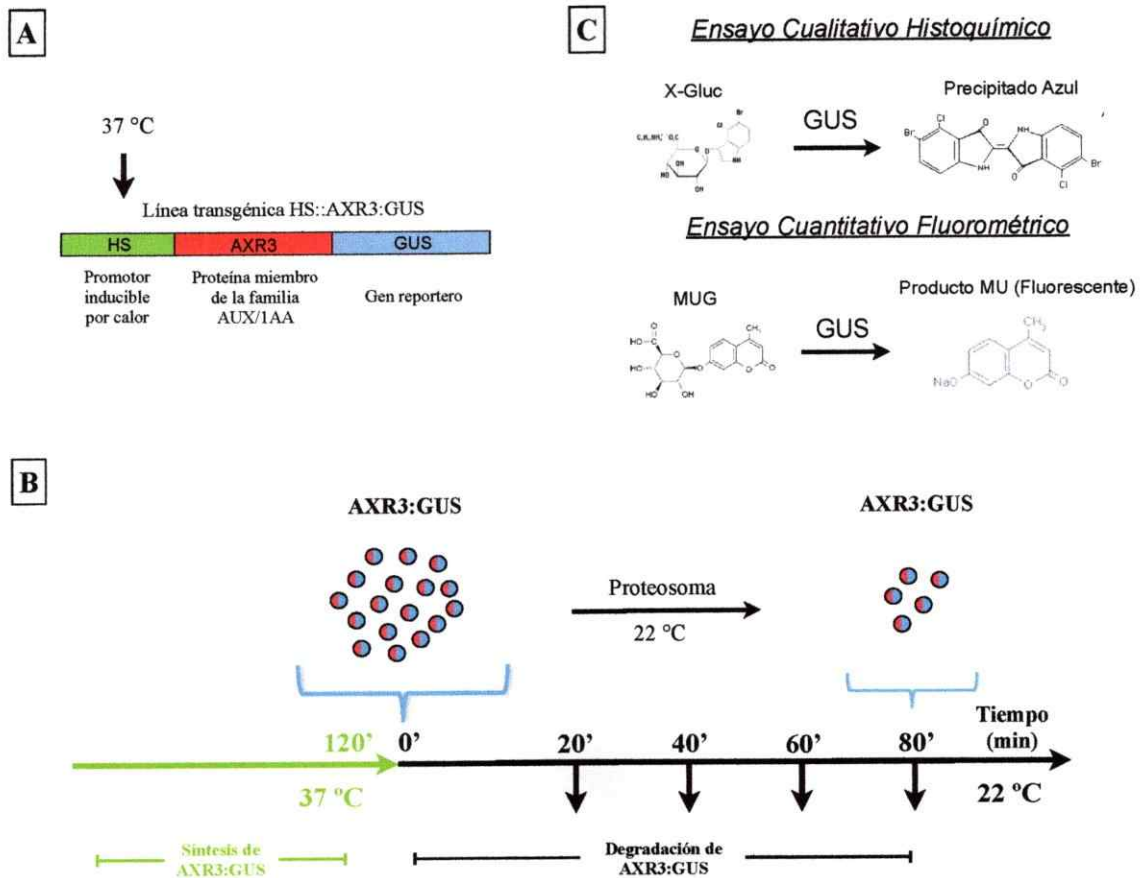


Figura 4. **A, Esquema de la estrategia usada para el análisis de la degradación del represor nuclear AXR3.** (A) El promotor *Heat Shock* (HS) es activo en la expresión del transgen AXR3:GUS cuando las plántulas son incubadas a 37°C. (B) La proteína AXR3:GUS sintetizada durante el shock térmico a 37°C se degrada a 22°C, por acción del proteosoma y la señalización de auxina. Se toman muestras a los 20, 40, 60 y 80 minutos después de la inducción por calor. (C) La enzima codificada por GUS (β -glucuronidasa) tiene la capacidad de modificar a los sustratos X-Gluc y MUG. Cuando X-Gluc es modificado se genera un precipitado azul. Cuando MUG es hidrolizado se forma un producto fluorescente que permite cuantificar los niveles del producto génico AXR3NT:GUS.

2.12.1 Análisis de la actividad de GUS

Midiendo la actividad de la enzima β -glucuronidasa se puede cuantificar la cantidad de proteína AXR3NT:GUS presente después de la inducción por temperatura. La actividad enzimática se midió usando dos estrategias: el ensayo histoquímico y el fluorométrico. En el ensayo histoquímico se observa la aparición de un precipitado azul en los tejidos en donde se expresa GUS. El producto azul es el resultado de la

conversión del sustrato comercial X-gluc por acción de la enzima. En el ensayo fluorométrico se cuantifica la actividad de GUS al determinar la fluorescencia que genera el producto MU.

2.12.1.A Ensayo histoquímico

Para corroborar que el tiempo de inducción es suficiente para inducir la expresión y síntesis de AXR3:GUS, y además, para poder reconocer las zonas de la plántula donde se observa acumulación de la proteína, se realizó un ensayo histoquímico de la actividad de GUS. Para esto, luego de la inducción a 37 °C (2 horas) las plántulas son incubadas durante 1 hora a 22 °C (Gray y Col., 2001; Hayashi y Col., 2003) (Hayashi y col., 2003). Posteriormente, se trasladaron a 2 mL de la solución reveladora que contiene el sustrato X-gluc (X-gluc 1mg/mL, tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 7, EDTA 10 mM pH 8, TX-100 0,1% v/v, K-ferricianida 2 mM, K-ferrocianida 2 mM). La entrada del sustrato X-Gluc al tejido se promueve sometiendo las plantas a vacío (85 KPa) por 15 minutos. Posteriormente, se incubaron en placas durante 48 horas a 37°C. Se detuvo la reacción retirando la solución de sustrato y reemplazándola por etanol 70%, agitando por 30 minutos con el objetivo de remover la clorofila de los tejidos fotosintéticos y así permitir observar de mejor manera la coloración.

2.12.1.B Ensayo fluorométrico

En este ensayo se usó un análogo de X-Gluc llamado 4-metil-umbeliferil-b-D-galactosa (MUG). El sustrato MUG genera, catalizado por la enzima GUS, un producto fluorescente llamado 4-metil-umbeliferona (MU) (Fior y col., 2009).

Se recolectaron aproximadamente 30 mg de tejido vegetal (15 plántulas), los que fueron depositados en tubos y congelados con nitrógeno líquido. Se agregó a cada tubo 200 µL del buffer de extracción (BE) de proteínas totales (tampón de fosfato de sodio pH 7,1 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1 % v/v, SDS 0,1 % m/v, DTT 5 mM). Se molió el tejido usando pistilos de homogenización y luego se centrifugó

durante 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue transferido a nuevos tubos y almacenado en refrigeración a -80 ° C hasta su uso.

La reacción enzimática se realizó utilizando un protocolo adaptado de Jefferson y col., 1987 en placas de microtitulación de 96 pocillos. La reacción se llevo a cabo en BE en un volumen total de 250 μ L y usando 75 μ g del extracto de proteínas. La concentración final del sustrato de la reacción, MUG, fue de 1 mM. La reacción se incubó a 37 °C durante distintos tiempos (0, 5, 15 y 30 min). Para detener la reacción enzimática se tomaron 50 μ L de la reacción y fueron agregados a 200 μ L de una solución de carbonato de sodio 0,2 M. La reacción se detuvo a causa de la denaturación de la enzima, en respuesta al cambio de pH causada por el carbonato de sodio.

La fluorescencia del producto MU (Figura 4C) se midió usando el filtro de excitación 360/40 nm y se capturó la emisión con el filtro 440/30 nm, para lo que se utilizó el fluorímetro lector de placas de microtitulación BioTek Synergy2 ®.

Se usó una curva de calibración de MU (desde 100 mM hasta 1000 mM) para convertir las unidades de fluorescencia registradas, a moles de producto MU. La actividad enzimática de GUS se calculó dividiendo los mol de MU obtenido por la masa de proteína total usada para el ensayo. La cuantificación de proteínas totales de los extractos se realizó mediante el método Bradford midiendo a 585 nm (Bradford, 1976).

Los datos fueron, procesados, graficados y analizados estadísticamente con el programa computacional Microsoft Excel® y Graphpad Prism 5.0®.

RESULTADOS

3.1 Sortin2 destina a las proteínas de membrana plasmática a vacuola.

Anteriormente hemos descrito en nuestro laboratorio que por efecto de Sortin2 se observa acumulación de fluorescencia proveniente de proteínas de membrana plasmática como PIN1:GFP, PIN2:GFP y BRI1:GFP en compartimentos intracelulares con morfología de vacuola (Pérez, 2009). Para comprobar que estos compartimentos observados corresponden efectivamente a vacuola se usaron dos estrategias diferentes.

La primera estrategia, usa el principio óptico del contraste diferencial de interferencia (DIC), también conocida como microscopía Nomarski, que permite obtener información acerca de la densidad óptica de la muestra generando una imagen pseudo tridimensional. La estrategia de identificar compartimentos vacuolares usando microscopía DIC (Kleine-Vehn y Col., 2008), se llevó a cabo tratando plántulas BRI1:GFP de 7 días durante 24 hrs con Sortin2 en MSC. Luego, las células del ápice de la raíz principal de éstas plantas fueron analizadas en el microscopio confocal (Figura 5 A-C). Como ya se ha descrito, bajo tratamientos con Sortin2 se observa acumulación de BRI1:GFP en cuerpos intracelulares (flecha roja Figura 5A). En el canal de resolución DIC, se observan los relieves que corresponden a las vacuolas (flecha amarilla Figura 5B). La superposición de las imágenes revelan que la acumulación de BRI1:GFP co-localiza con los relieves que se evidencian en el canal DIC (flecha azul Figura 5C).

La segunda estrategia, utiliza la tinción fluorescente FM4-64, un compuesto químico que se une a la membrana plasmática y trafica por la ruta endocítica hasta llegar a la membrana vacuolar (tonoplasto). Plantas PIN2:GFP de 7 días tratadas con Sortin2 durante 6 horas en MLC muestran acumulación de PIN2:GFP en grandes

cuerpos intracelulares (flecha rojas Figura 5D). Las últimas 2 horas de tratamiento con Sortin2 se realizó en presencia de FM4-64. Durante este tiempo de tratamiento el marcador FM4-64 es internalizado desde la membrana plasmática hacia la membrana vacuolar (flecha amarilla Figura 5E). La superposición de las imágenes permite distinguir a la acumulación de PIN2:GFP en el lumen de la vacuola, que está delimitada por el marcador FM4-64 (flecha azul Figura 5F).

Estas dos estrategias: 1) co-localización de BRI1:GFP con la estructura vacuolar revelada por DIC y 2) co-localización de PIN2:GFP con el marcador endocítico fluorescente FM4-64, permitieron corroborar que bajo la acción de Sortin2 las proteínas de membrana plasmática PIN2:GFP y BRI1:GFP se internalizan hacia compartimentos vacuolares.

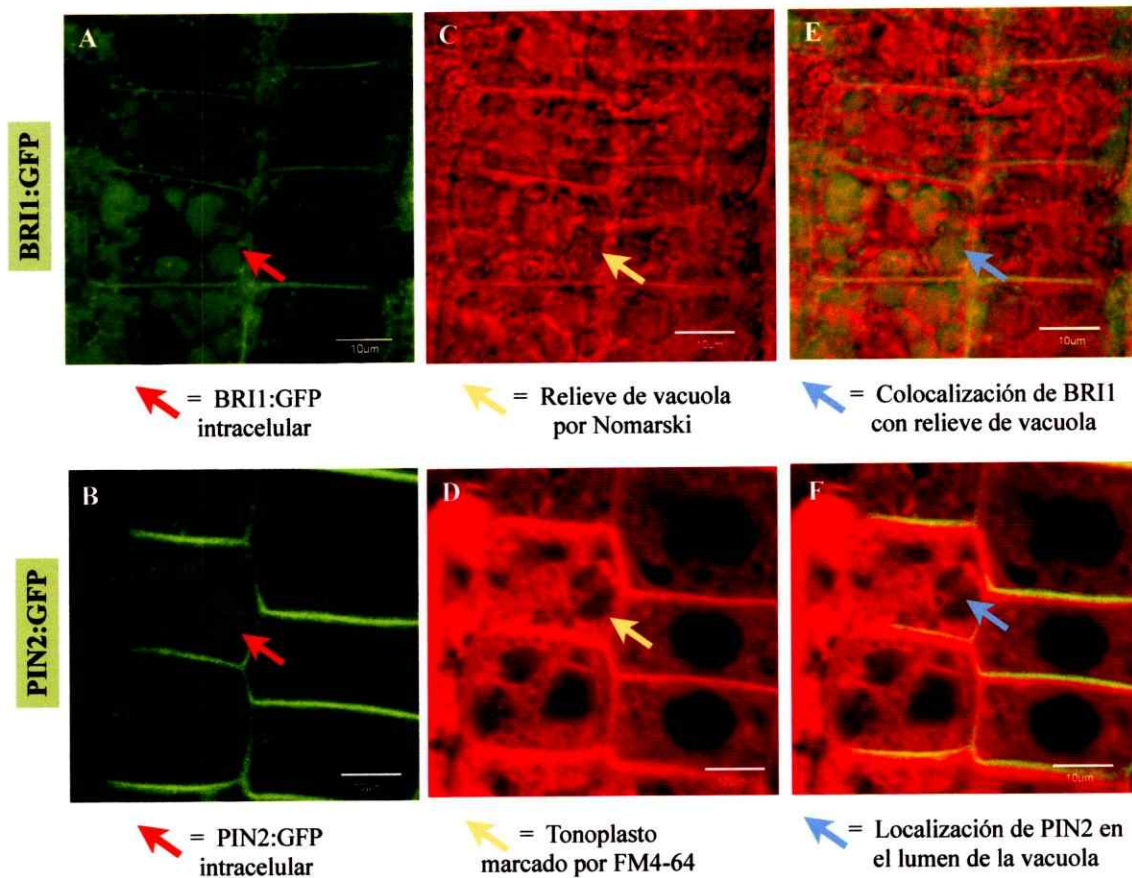


Figura 5. Sortin2 destina proteínas de membrana plasmática a la vacuola. (A,C,E) Plántulas BRI1:GFP de 7 días fueron tratadas por 24 horas en MSC conteniendo Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B,D,F) plántulas PIN2:GFP de 7 días fueron tratadas en MSL conteniendo Sortin2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 6 horas. Las últimas 2 horas de tratamiento se hicieron en presencia de FM4-64 20 μM (A,B). Fluorescencia proveniente del canal GFP que muestra acumulación intracelular de BRI1:GFP y PIN2:GFP, respectivamente. (C) La imagen de microscopía DIC es pseudocoloreadas en rojo. Los relieves corresponden a vacuolas (flecha amarilla). (D) FM4-64 fue internalizado desde la membrana plasmática permitiendo observar la membrana vacuolar (flecha amarilla). (E) Superposición de A y C. La señal intracelular de BRI1:GFP co-localiza con los relieves de la microscopía DIC (F) Superposición de B y D. La señal intracelular de PIN2:GFP se encuentra en el lumen de la vacuola marcada por FM4-64. El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 6 plántulas en cada oportunidad.

3.2 Sortin2 altera selectivamente la localización de proteínas de membrana plasmática.

Para analizar los efectos que Sortin2 provoca sobre uno de los componentes más importantes del SE, la membrana plasmática (MP), se observó la localización de proteínas marcadoras de MP frente al tratamiento con Sortin2. Para facilitar el análisis de esta sección, se resolvió clasificar los marcadores de MP que se usaron, en dos tipos: 1) de localización compartida entre MP y endosomas (AUX1 y PIN7) (Geldner y Col., 2007) y 2) de localización exclusiva en MP (PHOT1 y PIP2A) (Cutler y Col., 2000; Sakamoto y Briggs, 2002).

3.2.1 Proteínas de membrana plasmática que reciclan desde los endosomas

Kleine-Vhen y Col., 2006 ha mostrado que el transportador de eflujo de auxina PIN1 trafica por una vía distinta de la del importador de auxina AUX1. PIN1 y AUX1 muestran diferentes sensibilidades frente a la droga Brefeldina A. La localización de la proteína AUX1:YFP no es afectada por Brefeldina A, mientras que PIN1 si lo es. Debido a que sabemos que Sortin2 deslocaliza a la proteína PIN1:GFP (Pérez, 2009) se decidió evaluar si es que Sortin2 es capaz de afectar diferencialmente las vías de tráfico de AUX1 y PIN1. Para esto, se sometió a tratamiento con Sortin2, a plántulas de la línea AUX1:YFP. Como se observa en la **Figura 6** la proteína AUX1:YFP se observa en membrana plasmática tanto en las plántulas crecidas en condiciones control (**Figura 6A**) como en aquellas crecidas en Sortin2 25 µg/mL (**Figura 6B**). Por lo tanto, Sortin2, al igual que Brefeldina A, altera la localización de PIN1 pero no la de AUX1.

Por otro lado, otras drogas que alteran el tráfico en el sistema de endomembranas como Endosidin 1 (ES1) han permitido detectar una ruta común entre PIN1 y otro miembro de la familia PIN que se denomina PIN7 (Robert y Col., 2008). Debido a que Sortin2 afecta la localización de PIN1 (Pérez, 2009), se decidió evaluar si

es que el efecto de Sortin2 se produce al nivel de la ruta compartida entre PIN1 y PIN7. Para esto, se evaluó la localización de PIN7:GFP en plantas tratadas con Sortin2. En la **Figura 6C** se señala con flechas azules la localización de PIN7 en la membrana plasmática de células de la columela en condiciones control. Esta localización no se altera cuando las plántulas fueron crecidas en presencia de Sortin2 (**Figura 6D**). Por lo tanto, Sortin2, de manera distinta a lo que produce ES1, afecta la localización de PIN1, pero no la de PIN7.

Los resultados anteriores, en conjunto, indican que Sortin2 es selectivo al alterar la localización de los transportadores de auxina. Sortin2 permite distinguir las vías de tráfico independientes que siguen PIN1 y AUX1, coherentemente con lo descrito usando Brefeldina A. Pero, al mismo tiempo, Sortin2 afecta mecanismos de tráfico celular distintos de los que afecta ES1, evidenciando que Sortin2 tiene efectos específicos y diferentes a los de otras drogas que alteran el SE. Además, actuando distinto de ES1, permite proponer una vía de tráfico para PIN7 distinta de PIN1, ya que Sortin2 no altera la localización de PIN7.

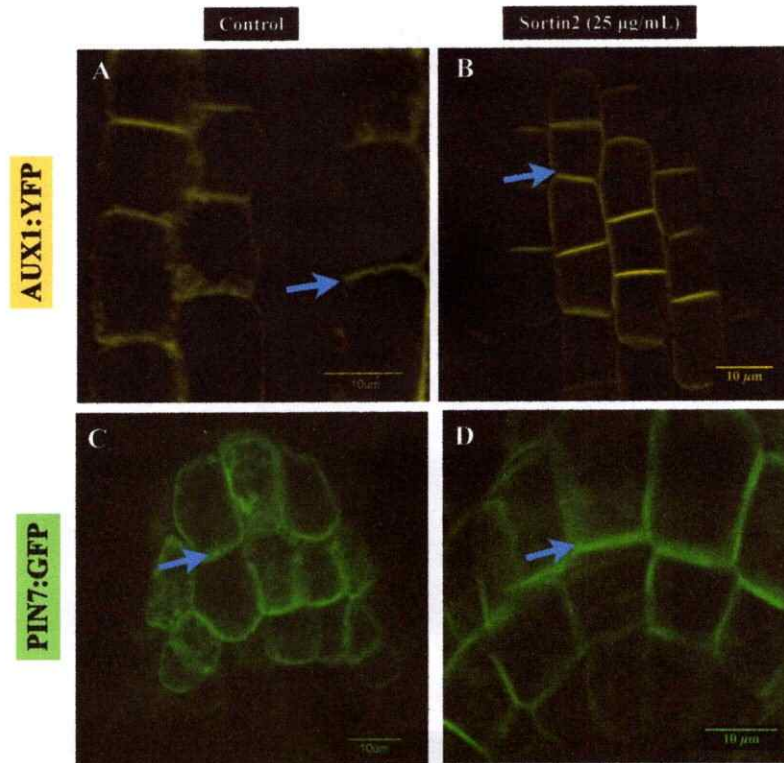


Figura 6. **Sortin2 es selectivo al alterar proteínas con localización en membrana plasmática.** Plantas de las líneas transgénicas AUX1:YFP y PIN7:GFP fueron crecidas en placas control y placas conteniendo Sortin2 25 $\mu\text{g/mL}$ durante 7 días. Posteriormente, fueron analizadas mediante microscopía confocal (A) Células de la vasculatura de la raíz principal muestran localización polar del transportador de influjo AUX1 en la membrana plasmática. (B) Las plántulas tratadas con Sortin2 no muestran alterada la localización del transportador AUX1. (C) Células de la columela de la punta de la raíz muestran localización de PIN7 en membrana plasmática. (D) El patrón que muestra PIN7 en condiciones control no se ve alterado por efecto de Sortin2. El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad. Las flechas azules indican localización en membrana plasmática de los marcadores analizados.

3.2.2 Proteínas de membrana plasmática que no reciclan desde los endosomas

En la sección anterior se analizó el efecto de Sortin2 sobre dos marcadores que comparten las siguientes características: 1) están involucradas con el transporte de auxina y 2) reciclan entre membrana plasmática y endosomas. En esta sección se analizó la localización de proteínas de membrana plasmática que no tienen las características anteriormente mencionadas.

Primero, se analizó a la proteína marcadora PIP2A:GFP que se localiza exclusivamente en la membrana plasmática (**Figura 7A**(Cutler y Col., 2000; Tian y Col., 2004). Se realizaron dos tipos de tratamientos con Sortin2: germinación en presencia de Sortin2 y tratamiento con el compuesto químico durante 24 horas en MSC. En ambos casos, la fluorescencia de GFP se observa difusa en el espacio intracelular (**Figura 7B**). Estos resultados sugieren que Sortin2 estimula el tráfico de esta proteína desde la membrana plasmática hacia un tipo de compartimento intracelular que no es morfológicamente identificable como uno de los compartimentos clásicos del sistema de endomembranas.

Para visualizar de mejor manera que Sortin2 efectivamente induce un aumento de localización de PIP2A en el espacio intracelular, se realizó un perfil de fluorescencia (**Figura 7C y 7D**) desde los puntos P hasta los puntos Q señalados en las imágenes de la **Figura 7A y 7B**, respectivamente. El perfil de fluorescencia asociado a la imagen control (**Figura 7C**) permite observar picos de fluorescencia (flechas rojas) y una disminución de ésta (líneas azules). Estas fluctuaciones de fluorescencia son el reflejo de la presencia de PIP2A en la membrana plasmática y a la ausencia de PIP2A en el espacio intracelular, respectivamente. El perfil de fluorescencia de la imagen de plantas sometidas a tratamientos con Sortin2 (**Figura 7D**), carece de la periodicidad que se observa en condición control. Una segunda forma de observar el efecto de Sortin2 sobre la localización de PIP2A es analizando diagramas de superficie. Estos diagramas representan tridimensionalmente la intensidad de fluorescencia de cada *pixel* de las imágenes de la **Figura 7A y 7B**. De esta manera se puede observar de forma más gráfica que bajo tratamientos con Sortin2 la fluorescencia de PIP2A:GFP no solo proviene de la membrana plasmática sino también desde el espacio intracelular (comparar **Figura 7E y 7F**), lo cual indica que Sortin2 deslocaliza a PIP2A de su ubicación en membrana plasmática.

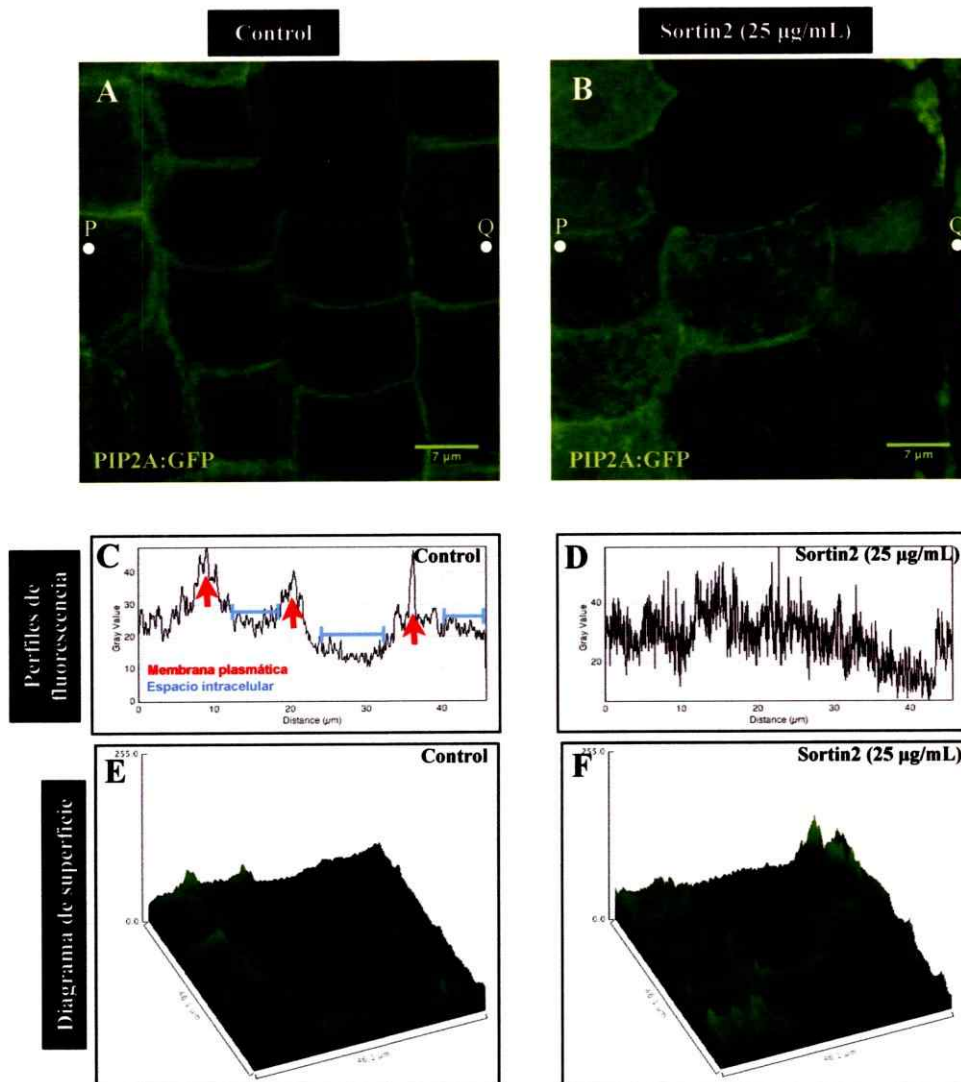


Figura 7. Sortin2 deslocaliza a la proteína de membrana plasmática PIP2A que no presenta reciclaje. Plántulas de la línea PIP2A:GFP fueron crecidas por 7 días en MSC y tratadas por 24 horas en MSC con Sortin2 25 µg/mL. (A) PIP2A:GFP, en condiciones control se localiza en la membrana plasmática. (B) En presencia de Sortin2 la fluorescencia de PIP2A:GFP se presenta difusa en el espacio intracelular (C,D) *Perfiles de fluorescencia* generados entre los puntos P y Q de las imágenes de A y B. (C) *Perfil de fluorescencia* de la imagen A. En plantas controles se observan picos y valles de fluorescencia que corresponde a membrana plasmática y espacio intracelular, respectivamente (D) *Perfil de fluorescencia* de la imagen B. La fluorescencia de plantas tratadas con Sortin2 se observa como una señal homogénea, indicando que la fluorescencia proviene tanto de la membrana plasmática como del espacio intracelular. (E,F) *Diagramas de superficie* obtenidas a partir de las imágenes de A y B. (E) Diagrama de superficie de la imagen A. Se puede reconocer la ausencia de fluorescencia en el espacio intracelular en células de la condición control (F). Diagrama de superficie de la imagen B. No hay ausencia de fluorescencia que permita observar el espacio intracelular. El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 4 plántulas en cada oportunidad.

Para evaluar el efecto de Sortin2 sobre una segunda proteína de localización exclusiva en membrana plasmática, se usó la línea que expresa la proteína de fusión PHOT1:GFP. PHOT1 corresponde a un fotorreceptor y se expresa en células del hipocótilo en plantas crecidas en luz (Sakamoto y Briggs, 2002). En condiciones control, el receptor se localiza en membrana plasmática (**Figura 8A**). Sin embargo, cuando las plántulas son tratadas con Sortin2 por 24 horas se observa localización intracelular del receptor en estructuras circulares tanto a concentraciones de 25 µg/mL como a 50 µg/mL. Usando análisis de correlación de imágenes (ICA) se pudo detectar que la fluorescencia de PHOT1 (en verde) no corresponde a fluorescencia de la clorofila (en rojo), ya que los gráficos de correlación (**Figura 8B**) indican que no hay co-localización de ambas fluorescencias. Esto implica que la proteína PHOT1 es internalizada a compartimentos que sería distintos de cloroplastos por acción de Sortin2.

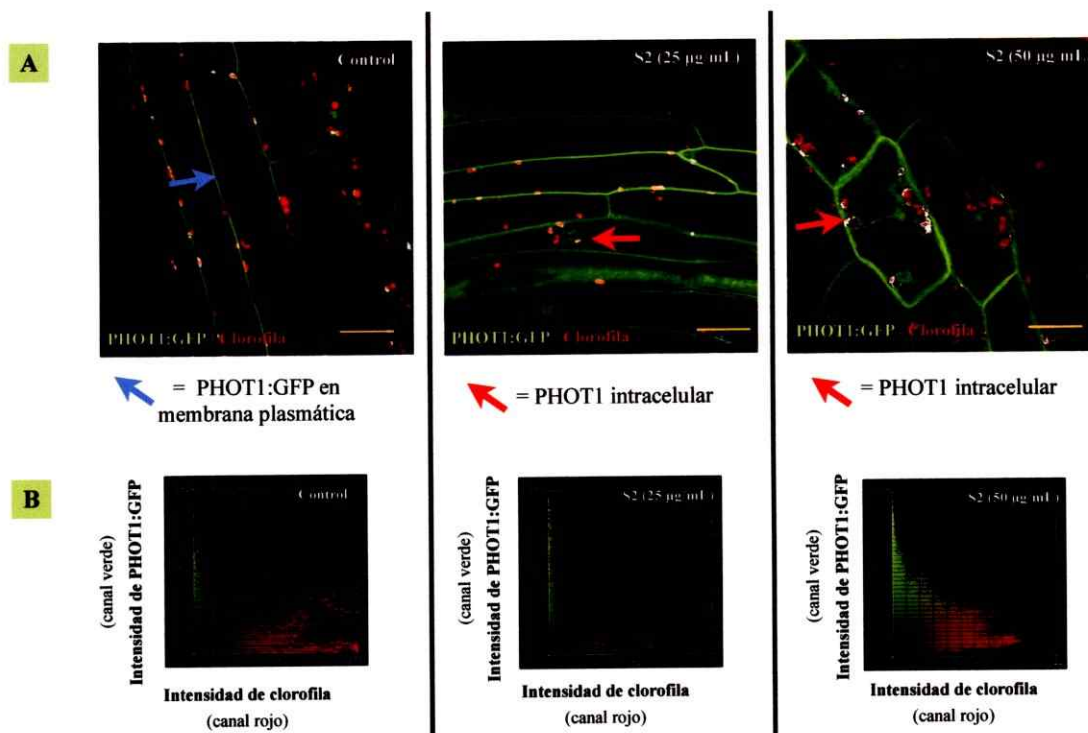


Figura 8. Sortin2 deslocaliza a la proteína de membrana plasmática PHOT1 que no presentan reciclaje. Plántulas de la línea PHOT1:GFP fueron crecidas en MSC por 7 días y tratadas en MSC con Sortin2 25 µg/mL y 50 µg/mL durante 24 horas (**A**) El fotorreceptor PHOT1 se localiza en la membrana plasmática (MP) en condiciones control (flecha azul). Sortin2 25 µg/mL y 50 µg/mL induce internalización de PHOT1 acumulándose intracelularmente en estructuras circulares (flechas rojas). Las imágenes corresponden a la superposición de la fluorescencia captada en el canal rojo (clorofila) con la captada en el canal verde (PHOT1:GFP). El color blanco denota los lugares donde co-localización de las señales. La co-localización es mínima como los muestran los análisis de correlación. (**B**) Análisis de correlación de imagen (ICA) para cada una de las imágenes de la sección A. Una correlación perfecta se grafica como una diagonal. Los perfiles de ICA muestran que la fluorescencia de PHOT1:GFP (verde) no colocaliza con la fluorescencia de la clorofila (rojo). El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 4 plántulas en cada oportunidad. Las barras de tamaño están indicadas.

3.3 Sortin2 altera la morfología de algunos componentes de la ruta endocítica

Considerando que Sortin2 tiene un efecto sobre proteínas de membrana plasmática que reciclan desde endosomas como PIN1 y PIN2 (Pérez, 2009), se evaluó el efecto de Sortin2 sobre los principales componentes endocíticos del sistema de endomembranas. Para esto, se analizaron líneas transgénicas con marcadores fluorescentes para tres tipos de componentes. Los endosomas tempranos fueron

analizados usando el marcador VHA-a1 (**Figura 9A**). VHA-a1 corresponde a una ATPasa tipo V, también llamadas bombas de protones vacuolares. Los endosomas tardíos fueron observados con la proteína Ara7 que corresponde a una GTPasa monomérica del tipo Rab (**Figura 9C**). La syntaxina de planta SYP22 fue utilizada como marcador de la membrana vacuolar (tonoplasto), el último compartimento endocítico (**Figura 9E**).

Los análisis fueron realizados creciendo las plántulas en Sortin2 o tratando plántulas de 7 días por 24 horas. El TGN ha sido clásicamente asociado a la ruta secretoria y solo recientemente descrito como endosomas temprano. La fluorescencia punteada, característica del marcador de EE/TGN, VHA-a1, está inalterada en tamaño y disposición, por el tratamiento con Sortin2 (**Figura 9A,B**). Sin embargo, los marcadores de los otros componentes de la ruta endocítica: el compartimento pre vacuolar (Ara7:GFP) ó endosomas tardíos y el marcador de tonoplasto (SYP22:YFP) fueron alterados por efecto de Sortin2. Ara7:GFP muestra una notoria tendencia a agregarse en compartimentos más grandes indicados con flechas rojas (**Figura 9C,D**). En tratamientos con Sortin2 se observa una dispersión en la fluorescencia de Ara7:GFP haciendo difícil reconocer los bordes celulares. El marcador SYP22:YFP muestra, en cambio, una diferencia menos evidente. El patrón de fluorescencia que se observa en la imagen control muestra el límite del tonoplasto liso y uniforme (**Figura 9E**), en cambio, en condiciones con Sortin2, muestra un borde rugoso debido a aglomeraciones de marcador señaladas por las flechas rojas (**Figura 9F**).

Con los análisis de la localización de los marcadores frente a tratamientos de Sortin2 se pudo detectar una selectividad del químico a afectar componentes celulares de la ruta endocítica tardía frente a componentes de la ruta endocítica temprana. Antecedentes previos en el laboratorio indican además que marcadores de retículo

endoplasmático y de aparato de Golgi no muestran ser afectados por Sortin2 (Norambuena y Col., resultados no publicados)

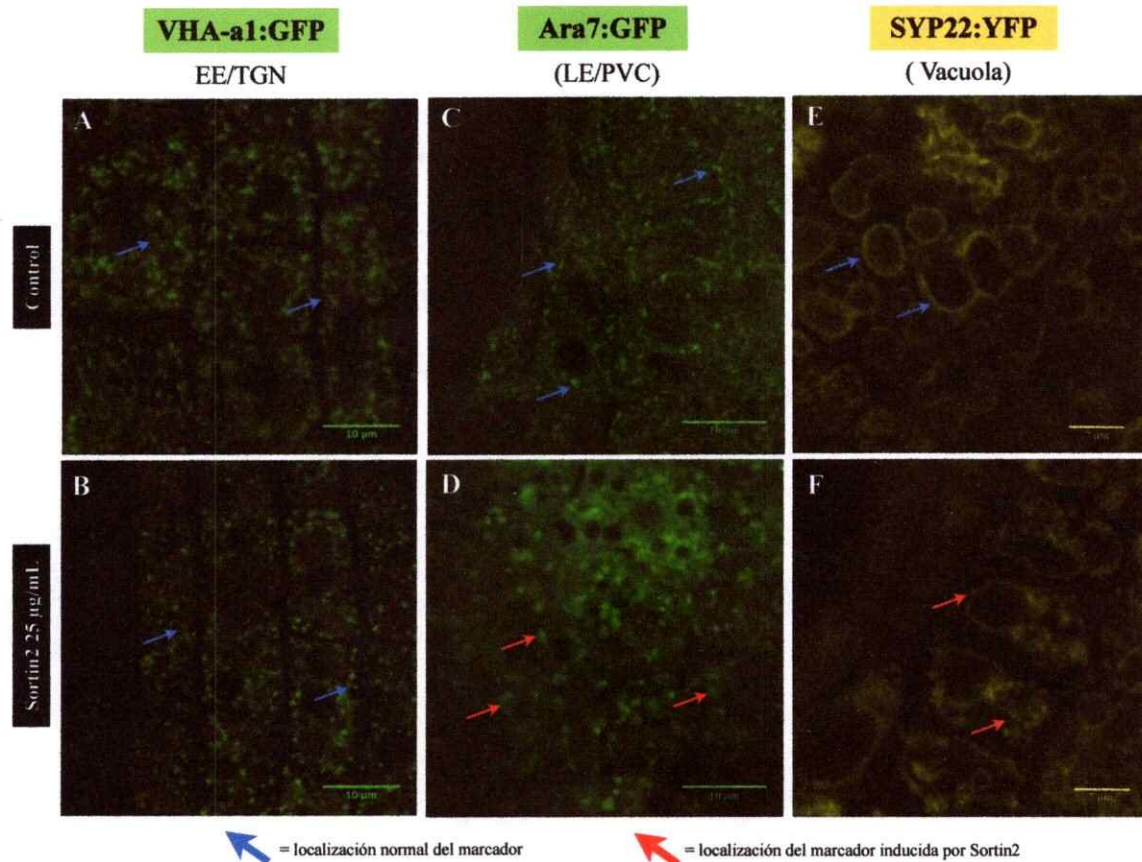


Figura 9. **Sortin2 es selectivo al alterar proteínas marcadoras de la ruta endocítica.** Plántulas de las 3 líneas aquí usadas fueron crecidas en MSC por 7 días y luego tratadas en MSC con Sortin2 25 µg/mL durante 24 horas. (A) VHA-a1, el marcador de EE/TGN, presenta un patrón punteado (flechas azules) de fluorescencia. (B) VHA-a1 no muestra una alteración cuando se analizan plántulas bajo tratamientos con Sortin2. (C) Ara7 es un marcador de LE/PVC y muestra un patrón de fluorescencia punteado (flechas azules) que bordea a los núcleos de cada célula. Los núcleos se denotan por ausencia de fluorescencia. (D) Bajo la acción de Sortin2, Ara7 también muestra un patrón punteado, pero se observan agregados de tamaño mayor y con una fluorescencia más difusa (flechas rojas). (E) SYP22 es un marcador de PCV y tonoplasto (flechas azules). (F) Bajo tratamientos con Sortin2 se observa un borde rugoso del tonoplasto (flechas rojas). El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad.

3.4 Sortin2 no altera los componentes de actina ni microtúbulos del citoesqueleto.

El sistema de andamiaje que da estabilidad estructural a las células es el citoesqueleto, con sus dos principales componentes: los filamentos de actina y los microtúbulos (Samaj y Col., 2004). El tráfico de diversas proteínas en vesículas a través del sistema de endomembras se ha descrito como dependiente del citoesqueleto (Geldner y Col., 2001). Para evaluar si es que Sortin2 interfiere en la célula a nivel de su citoesqueleto, se utilizaron dos estrategias diferentes.

La primera estrategia, fue mediante la línea transgénica estable ABD2:GFP, que expresa a la proteína de unión a actina ABD2 fusionada al reportero GFP. Con esto pudimos analizar cambios morfológicos en la estructura del componente actínico del citoesqueleto frente a tratamientos con Sortin2. Como se puede observar en la **Figura 10A**, el patrón de fluorescencia del marcador de citoesqueleto ABD2 no es alterado cuando las plantas son tratadas con Sortin2. Se ha detectado que ciertas drogas que alteran a los filamentos de actina (Dhonukshe y Col., 2008a) producen un aumento en el ancho de estos. Realizando un análisis digital de las imágenes se cuantificó que el ancho de los filamentos de actina no es alterado por acción de Sortin2 a las concentraciones 25 µg/mL y 50 µg/mL (**Figura 10B**).

La segunda estrategia para evaluar el efecto de Sortin2 en el citoesqueleto, utiliza drogas que interfieren la funcionalidad del citoesqueleto como Latrunculina B (LatB) y Oryzalin. Estas drogas han sido ampliamente usadas en modelos vegetales (Geldner y Col., 2001; Jelínková y Col., 2010). Los filamentos de actina y los microtúbulos se polimerizan en el extremo (+) y despolimerizan en el (-). LatB y Oryzalin se unen a los monómeros de actina F y tubulina, respectivamente, impidiendo su unión a los extremos (+) de los polímeros (Morejohn y Fosket, 1991; Morton,

Ayscough y McLaughlin, 2000). Entonces, ambas drogas tienen una actividad despolimerizante (Kaschani y van der Hooft, 2007).

Usando las drogas LatB, Oryzalin y Sortin2 se analizó su efecto en la dinámica de los endosomas marcados con PIN2:GFP. Para seguir la dinámica de los endosomas se obtuvo una colección de imágenes obtenidas a lo largo del tiempo de células de la punta de la raíz de plántulas tratadas con las drogas (**Figura 10C**). Se pseudocoloreó en rojo la primera imagen obtenida y en verde la última imagen de la serie temporal. La superposición de estas imágenes revela que LatB y Oryzalin afectan la dinámica de los endosomas marcados con PIN2 ya que hay una superposición perfecta indicando que no hay movimiento de endosomas. Sortin2, en cambio, no altera el movimiento de los cuerpos endosomales marcados por PIN2:GFP. La estrategia de analizar por medio de microscopía confocal el movimiento de los compartimentos endosomales marcados con PIN2:GFP fue usada anteriormente (Dhonukshe y Col., 2007).

Para obtener el grado de superposición para cada condición analizada se realizó un análisis de correlación de las imágenes (ICA). Los datos agrupados formando una línea diagonal en los gráficos de ICA (**Figura 10D**) representa una perfecta superposición de las imágenes a $t=0$ y $t=1$ min, obtenidas en la serie de tiempo. El ICA resultante para los tratamientos con Sortin2 muestran, en cambio, que no hay correlación, lo que indica movimiento de los cuerpos endosomales marcados por PIN2:GFP

De esta manera, mediante dos estrategias, morfología de los filamentos de actina marcados por ABD2 y la dinámica de cuerpos endosomales marcados con PIN2, se logró comprobar que Sortin2 no tiene un efecto sobre el citoesqueleto, ya sea

considerando la estructura de los filamentos de actina (ABD2) y la funcionalidad del citoesqueleto visualizando el movimiento de los endosomas.

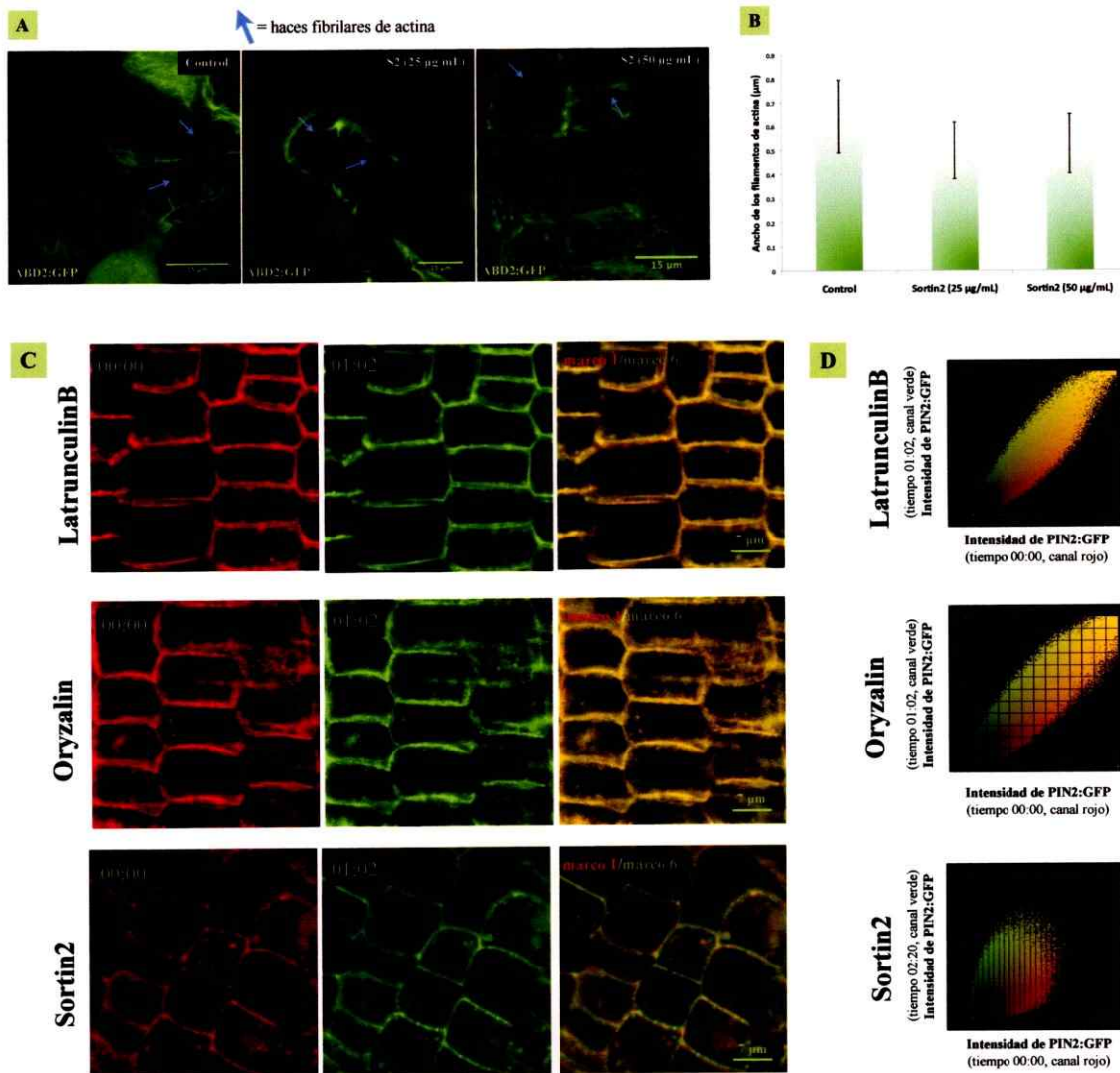


Figura 10. **Sortin2 no altera la funcionalidad del citoesqueleto como sí lo hacen las drogas Oryzalin y Latrunculina.** (A) Plántulas de la línea ABD2:GFP de 7 días fueron tratadas por 24 horas en MSC conteniendo Sortin2 a las concentraciones indicadas y luego observadas *in vivo* con microscopía confocal. (B) Cuantificación del ancho de los filamentos de actina (n=12 filamentos) usando tres imágenes representativas. (C) Plántulas de 7 días de la línea PIN2:GFP fueron tratadas en MSL conteniendo las drogas Oryzalin 10µM, Latrunculina B 20 µM o Sortin2 50µg/mL durante 6 horas en luz. Una serie de tiempo fue obtenida analizando plántulas sometidas a cada tratamiento. Luego, fueron analizadas con Imagej (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Se pseudocoloreó en rojo la imagen a tiempo cero y en verde la imagen a un tiempo posterior de 1 min. (D) Análisis de correlación de las imágenes (ICA) en la sección C. Un línea diagonal indica superposición de los cuerpos a los distintos tiempos, como lo observado en LatB y Oryzalin. El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 10 plántulas en cada oportunidad. Las barras de tamaño están indicadas.

3.5 Sortin2 acelera la internalización del trazador de endocitosis FM4-64

Considerando que Sortin2 induce la acumulación de PIN2 en la vacuola y que además altera a los marcadores de los componentes PVC y tonoplasto de la ruta endocítica (**Figura 9C-F**), se evaluó el efecto de este compuesto sobre la temporalidad de la internalización del trazador de endocitosis FM4-64. FM4-64 pertenece a una familia de tinciones esterólicas ampliamente usadas para el estudio de endocitosis, tráfico vesicular y organización de organelos en modelos eucarióticos (Bolte y Col., 2004). La tinción fluorescente FM4-64 se une específicamente a membrana y trafica por la ruta endocítica, marcando la membrana de distintos organelos en el tiempo (**Figura 11A**) hasta formar parte de la membrana de la vacuola (tonoplasto). Plantas de 7 días fueron incubadas con la tinción para evaluar la temporalidad de la endocitosis del marcador en la presencia de Sortin2. En condiciones control (**Figura 11B, Control**) luego del pulso con FM4-64, el marcador se encuentra en la membrana plasmática de las células de la punta de la raíz. Una hora después marca, además, endosomas que son los organelos intermediarios en el tráfico hacia el tonoplasto. El tonoplasto se visualiza sólo al cabo de 2 horas después del pulso con FM4-64 (**Figura 11B**). Sin embargo, en presencia de Sortin2 50 µg/mL la endocitosis del marcador, es acelerada (**Figura 11B, Sortin2**), ya que FM4-64 alcanza el tonoplasto al cabo de 1 hora después del pulso. Es decir, la presencia de Sortin2 durante el periodo de endocitosis del marcador logró disminuir al menos la mitad el tiempo necesario para que la tinción FM4-64 alcance la vacuola. Esto indicaría que Sortin2 altera algún componente de la maquinaria que regula el tráfico del marcador de endocitosis acelerando el proceso endocítico desde la membrana plasmática hacia el tonoplasto.

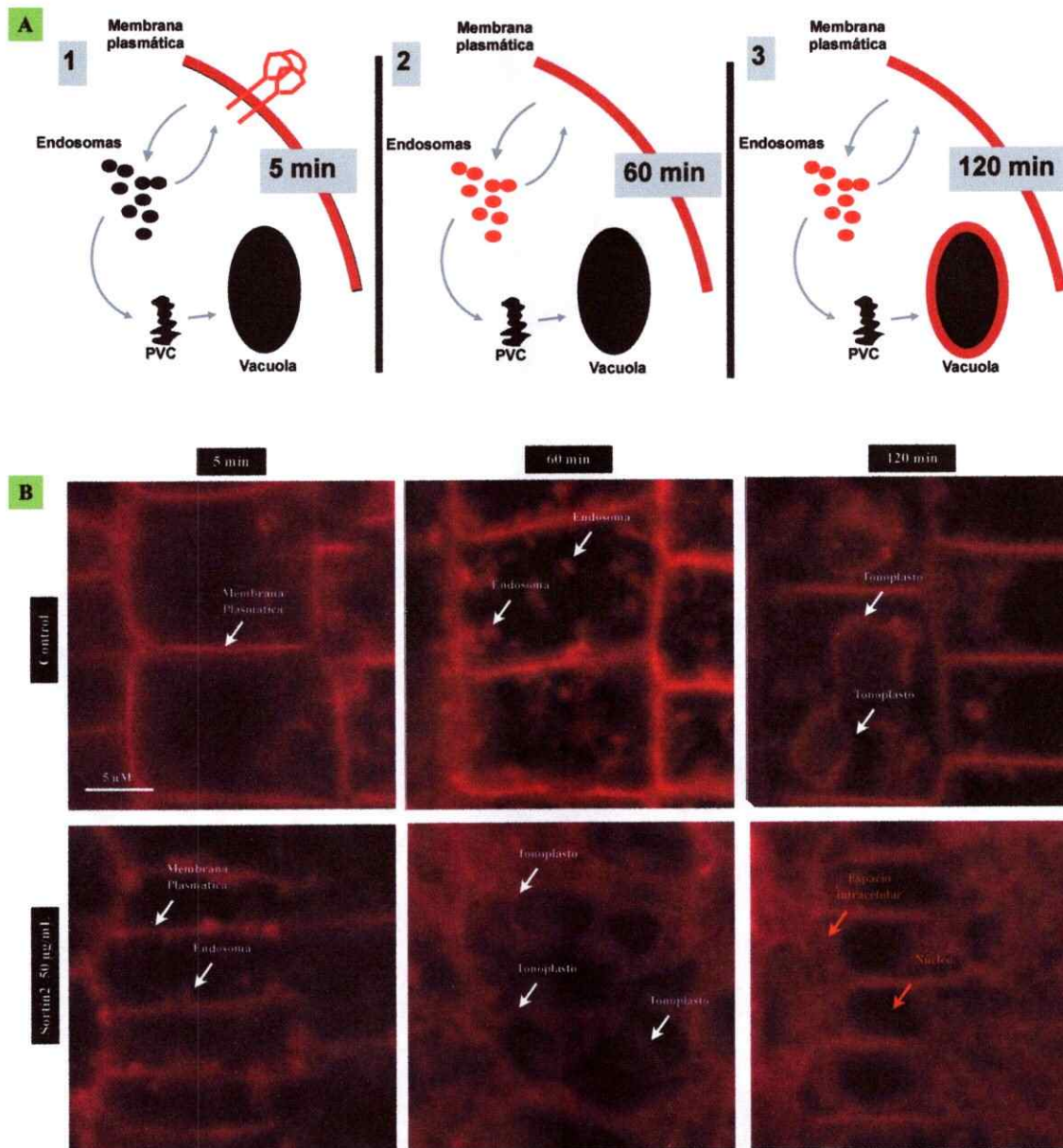


Figura 11. La internalización del trazador de endocitosis FM4-64 es acelerada en presencia de Sortin2. (A) Esquema del proceso de internalización de la tinción FM4-64. En los primeros minutos luego del pulso con el marcador, este se observa en la membrana plasmática (MP) [1]. Posteriormente marca además endosomas [2] y finalmente el tonoplasto [3]. (B) Internalización de FM4-64 en condiciones control y en presencia de Sortin2 50 µg/mL. El pulso se realizó con FM4-64 5 µM por 10 minutos a 4 °C en oscuridad. *Condición Control*. Después del pulso el marcador marca sólo MP (5 min) internalizándose hacia endosomas (60 min) para finalmente marcar tonoplasto (120 min). *Condición Sortin2*. El marcador se aglomera en ciertos puntos de la MP que tienen morfología de endosomas (5 min). Posteriormente, se localiza el trazador en el tonoplasto más tempranamente que en condiciones control (60 min). Una gran cantidad de membrana internalizada se observa en el espacio intracelular (120 min). El experimento se repitió 3 veces, analizando al menos 4 plántulas en cada oportunidad.

3.6 El efecto de Sortin2 sobre la localización de PIN2 es inducible en tratamientos en medio líquido de cultivo (MLC).

Mediante microscopía confocal, se observó en mi seminario de título que Sortin2 induce la destinación de PIN2 a compartimentos intracelulares tanto en plantas cuyas semillas fueron germinadas en presencia del compuesto químico (**Figura 12A**) como en tratamientos de 24 horas a plantas de 7 días. Concentraciones sobre 25 µg/mL produce una acumulación de PIN2:GFP en la vacuola. En esa ocasión, ambos tipos de tratamientos fueron realizados sobre medio sólido conteniendo Sortin2. Sin embargo, para el estudio de la endocitosis se utilizan drogas cuyo tratamiento se lleva a cabo generalmente en medio líquido. Para poder analizar los efectos concomitantes de Sortin2 con drogas usadas para el estudio de la endocitosis, se evaluó el efecto de Sortin2 en tratamientos en medio líquido (MLC). Con esto se logró determinar que menos de 6 horas de tratamiento en MLC son insuficientes para lograr observar la acumulación de PIN2 en vacuola. Como se observa en la **Figura 12B**, la internalización de PIN2 a vacuola se observó a tiempos superiores a 6 horas. Esto indicaría que el efecto de Sortin2 es inducible en plantas PIN2:GFP que tienen una correcta localización del transportador de auxina.

El tiempo que se requiere esperar para observar la destinación de PIN2 a vacuola en medio líquido es menor a la germinación de las semillas. Sin embargo, ambos métodos de exponer la planta a Sortin2 producen el mismo fenotipo. Esto es muy útil para la configuración experimental, ya que se puede cambiar de estrategia de acuerdo a los requerimientos de cada experimento.

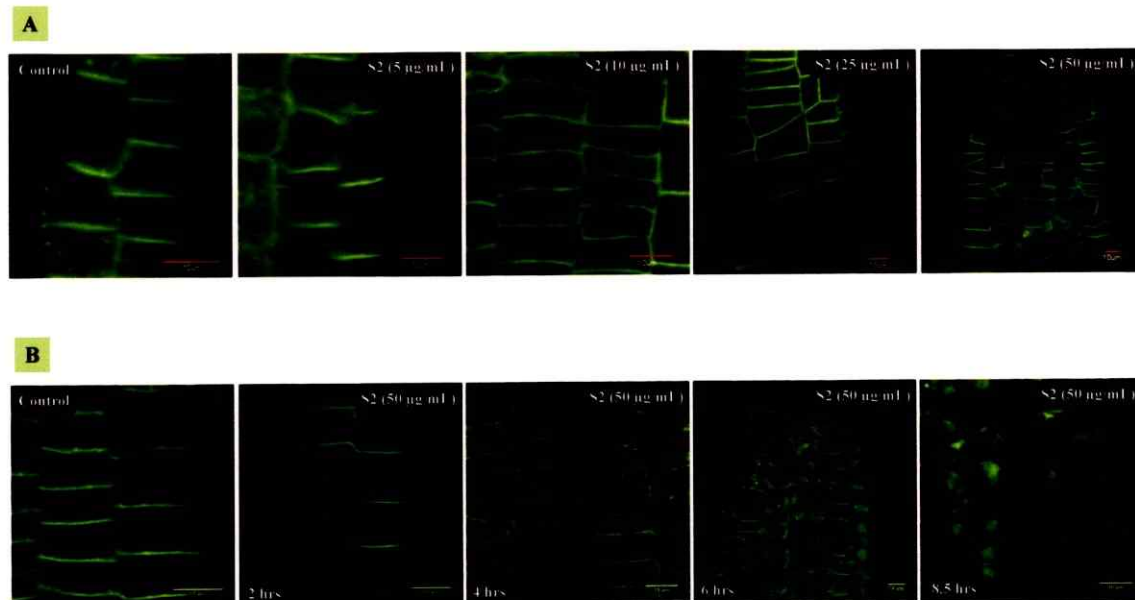


Figura 12. El efecto de Sortin2 es inducible. (A) Semillas de la línea transgénica PIN2:GFP son germinadas en MSC conteniendo Sortin2 a las distintas concentraciones señaladas. Concentraciones sobre 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produce una acumulación de PIN2:GFP en la vacuola **(B)**. Plántulas de 7 días de la línea PIN2:GFP son tratadas en MLC conteniendo Sortin2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante distintos tiempos. A dos y cuatro horas no se observa acumulación de PIN2 en la vacuola. La acumulación de PIN2 en la vacuola se hace evidente después de las 6 horas de tratamiento. El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 4 plántulas en cada oportunidad. Las barras de tamaño están indicadas.

3.7. Sortin2 induce la internalización de PIN2 hacia vacuola a través de la ruta endocítica.

A través del sistema de endomembranas hay tráfico tanto de proteínas recién sintetizadas por la ruta secretoria como de proteínas en la membrana plasmática que se internalizan por la ruta endocítica. Por lo tanto, la acumulación de PIN2 en la vacuola por efecto de Sortin2 podría ser consecuencia tanto de la proteína endocitada desde la membrana plasmática como de la proteína recién sintetizada traficando desde retículo endoplasmático hacia la vacuola. Para determinar la procedencia de la proteína PIN2 acumulada en vacuola por efecto de Sortin2, se utilizó el inhibidor de síntesis proteica cicloheximida, CHX. CHX permite aislar la ruta endocítica de la ruta secretoria (Kaschani y van der Hoorn, 2007). Como se puede observar en la **Figura**

13C la acumulación de PIN2 en vacuola, en el tratamiento con Sortin2, se observa aún en la presencia de CHX. Como es de esperar, esto no se observa en condiciones control (**Figura 13A**) y tampoco tratando con CHX durante 6 horas. Sin embargo CHX, produce un fenotipo de agregación de puntos altamente fluorescentes que es el resultado del deterioro celular producto de la ausencia de síntesis proteica (**Figura 13B**). Estos resultados indican que Sortin2 induce el tráfico de PIN2 desde la membrana plasmática hacia la vacuola, es decir, mediante la vía la ruta endocítica.

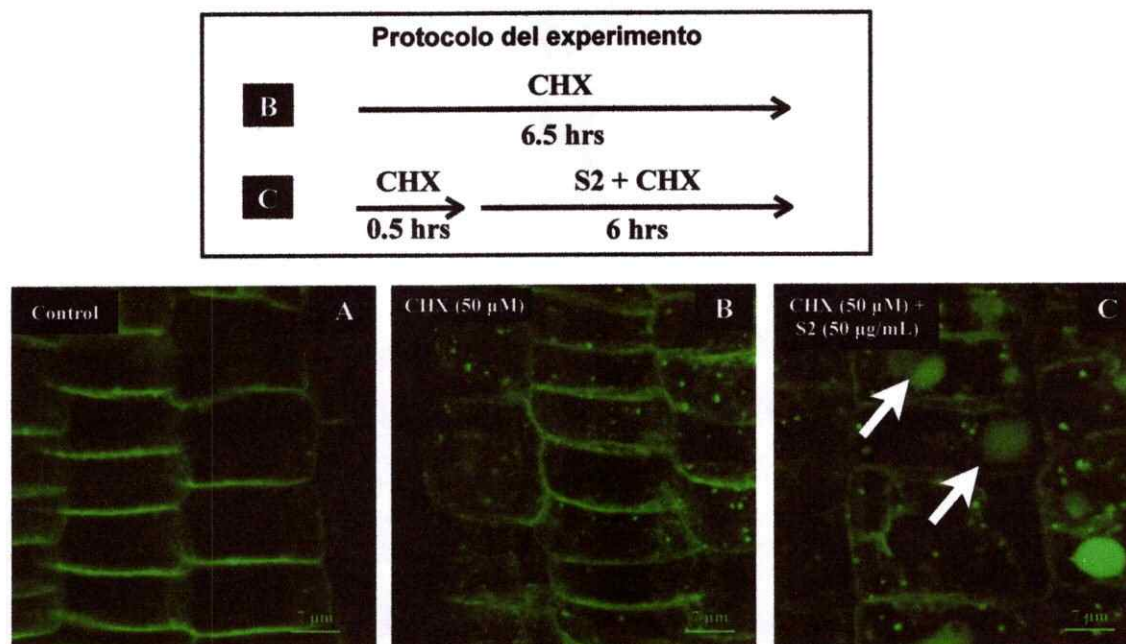


Figura 13. El efecto de Sortin2 sobre la localización de PIN2 se produce por la alteración de la ruta endocítica del sistema de endomembranas. Plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP fueron crecidas por 7 días en MSC y luego sometidas a los tratamientos según los protocolos descritos sobre las imágenes. **(A)** Tratamiento control que corresponde a 6 horas en MLC. **(B)** Tratamiento control de la acción de Cicloheximida (CHX) que corresponde a 6.5 hrs con la droga. CHX produce agregados altamente fluorescentes como respuesta al daño celular causado por la ausencia de síntesis proteica. Estos agregados no dificultan el análisis, porque no corresponden a compartimentos intracelulares endosomales. **(C)** Se observa acumulación PIN2:GFP en vacuola cuando las plantas son tratadas con Sortin2, incluso, en presencia del inhibidor de síntesis de proteínas CHX (flechas blancas). El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 8 plántulas en cada oportunidad.

3.8 El efecto de Sortin2 sobre la ruta endocítica antagoniza el efecto de Brefeldina A

Dentro del estudio de endomembranas, el proceso de ciclaje endocítico ha cobrado vital importancia debido a que estaría ligado con la señalización de ciertas hormonas vegetales (Paciorek y Col., 2005). La droga clásicamente usada para el estudio de este proceso es Brefeldina A (Nebenfuhr, 2002). BFA es un producto fúngico que inhibe la exocitosis de las proteínas desde los endosomas hacia la membrana plasmática. Esta alteración produce la agregación de los compartimentos endosomales de reciclaje observándose los llamados "cuerpos de BFA". Tratamientos con BFA por 2,5 horas en plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP permiten visualizar la acumulación proteica en los cuerpos de BFA (**Figura 14B**). La preincubación con Sortin2 por 30 minutos y luego una co-incubación Sortin2-BFA impide la acumulación de PIN2:GFP en los cuerpos de BFA (**Figura 14C**). Este fenómeno se podría deber a: 1) una inhibición de endocitosis de PIN2 ó 2) al efecto de Sortin2 destinando proteína hacia la vacuola (**Figura 5**) e impidiendo la aparición de PIN2 en los cuerpos de BFA. Según los resultados obtenidos en esta tesis, Sortin2 acelera endocitosis (**Figura 11**), por lo tanto, sería coherente poner a prueba la segunda opción. Para analizar la segunda opción, se prolongó el tratamiento de co-incubación Sortin2-BFA hasta 6 horas. BFA causa la acumulación de PIN2 en los cuerpos de BFA también en tratamientos por 6 horas (**Figura 14E**). Sin embargo, los co-tratamientos de BFA y Sortin2 presentan localización de PIN2 en vacuola, como es de esperar, por acción de Sortin2. Sin embargo PIN2 no se ubica en los cuerpos de BFA (**Figura 14F**). Esto sugiere que la acumulación en vacuola de PIN2:GFP impide la acumulación de esta proteína en los cuerpos de BFA. Los resultados en su conjunto comprueba que el efecto de Sortin2 no es inhibir la endocitosis de la proteína PIN2:GFP, sino promover su acumulación en la vacuola actuando río abajo de BFA.

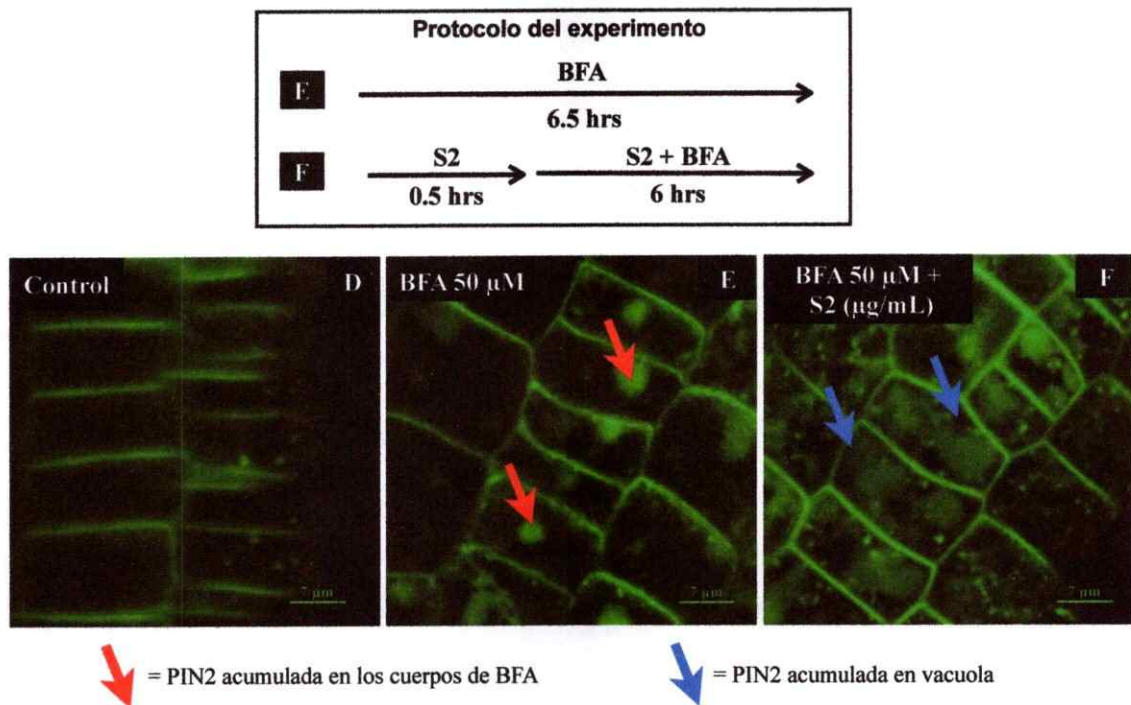
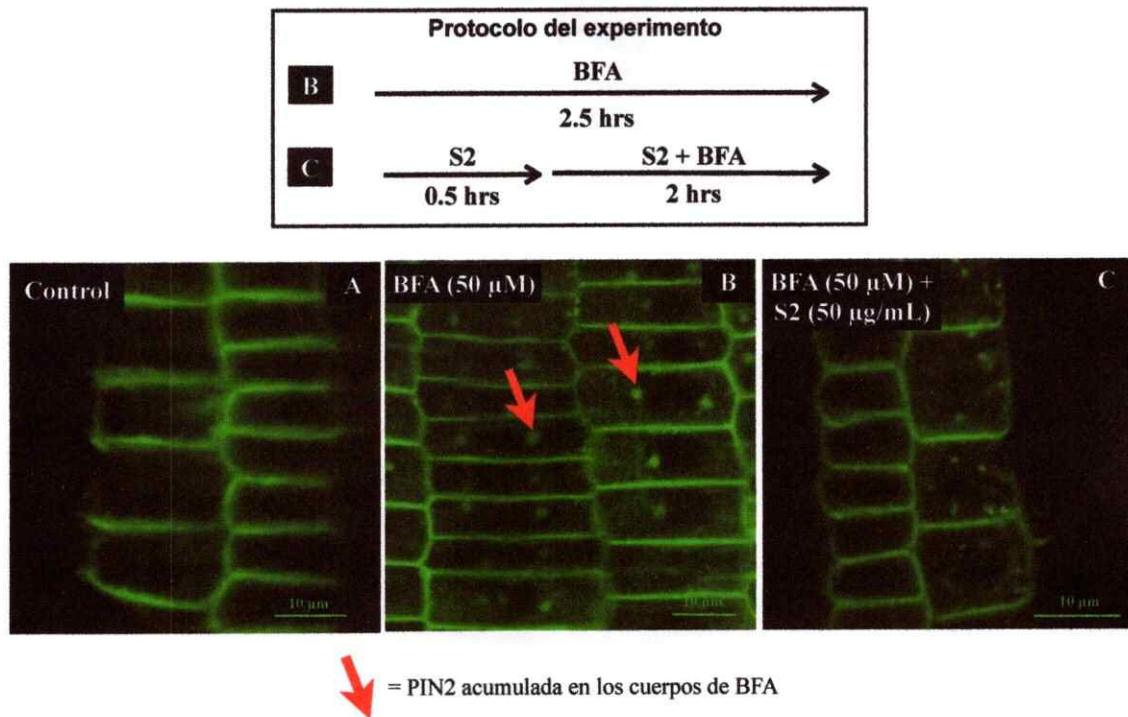


Figura 14. Sortin2 inhibe la acumulación de PIN2 en los cuerpos de BFA antagonizando el efecto de Brefeldina A. Plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP fueron crecidas por 7 días en MSC y luego sometidas a los tratamientos según los protocolos descritos sobre las imágenes. (A,D) Los tratamientos control corresponden

a 2.5 ó 6.5 horas en MLC. **(B)** En presencia del inhibidor de exocitosis Befeldina A (BFA) se acumula proteína PIN2:GFP en los llamados cuerpos de BFA (flechas blancas). **(C)** En co-tratamientos de BFA y Sortin2 durante 2 horas, PIN2:GFP no se localiza en los cuerpos de BFA. **(E)** Los cuerpos de BFA son más grandes que los observados en B, cuando el tratamiento se extiende por 6 horas (flecha blanca). **(F)** Co-tratamientos de BFA y Sortin2 durante 6 horas evidencian la acumulación de PIN2:GFP en vacuola y no en cuerpos de BFA. El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 8 plántulas en cada oportunidad.

Para corroborar que el efecto de Sortin2 inhibiendo la acumulación de PIN2 en los cuerpos de BFA es un efecto exclusivamente sobre la ruta endocítica, se utilizó nuevamente el inhibidor de síntesis de proteínas CHX. Se repitieron los protocolos de tratamiento usados en los experimentos de la **Figura 14A-C**, pero pre-incubando durante 0.5 hrs con la droga CHX. Como se ha descrito en la literatura, la acumulación de PIN2:GFP en los cuerpos de BFA es independiente de la síntesis de proteína (Geldner y Col., 2001) (**Figura 15B**). Sin embargo, la acumulación de PIN2 en los cuerpos de BFA es inhibida por Sortin2 inclusive en la presencia de CHX (**Figura 15C**), indicando que el efecto antagonista de Sortin2 sobre BFA es independiente del tráfico de proteína recién sintetizada.

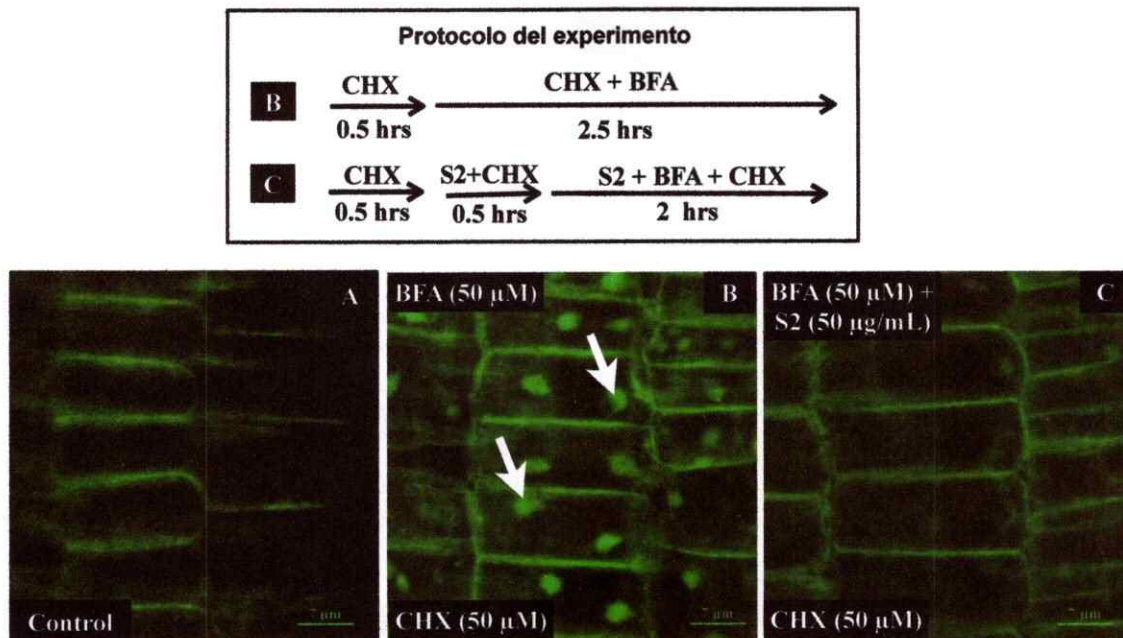


Figura 15. Sortin2 antagoniza el efecto de Brefeldina A alterando específicamente la ruta endocítica. Plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP fueron crecidas por 7 días en MSC y luego sometidas a los tratamientos según los protocolos descritos en A y B. (A) Tratamiento control que corresponde a 3 horas en MLC. (B) Tratamientos con Brefeldina A (BFA) en presencia de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica. Se observa acumulación de proteína provenientes desde membrana plasmática en los cuerpos de BFA (flechas blancas). (C) Co-tratamiento de BFA y Sortin2 en presencia de CHX. PIN2:GFP no se acumula en los cuerpos de BFA. El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 8 plántulas en cada oportunidad.

3.9 Sortin2 produce una remoción de proteína PIN2 desde los cuerpos de Brefeldina A destinándola a vacuola.

En la **Figura 14F** se muestra que Sortin2 induce acumulación de PIN2 en la vacuola inclusive en la presencia de BFA. Esto indica que la acción de Sortin2 es sobre los mecanismos de tráfico de PIN2 desde la membrana plasmática hacia la vacuola. Además sugiere que PIN2 estaría siendo removido desde los cuerpos de BFA y destinado a vacuola, ya que en los co-tratamientos Sortin2-BFA no hay doble localización (cuerpos de BFA y vacuola) sino solo acumulación de PIN2 en vacuola. Para comprobar esto, se evaluó el efecto de Sortin2 una vez que PIN2 se encuentra

acumulado en los cuerpos de BFA. Como se observa en la **Figura 16A** en el tratamiento control (BFA por 3.5 hrs) se observa PIN2:GFP en los cuerpos de BFA. Tratamientos con Sortin2 durante 2 hrs no logran inducir la localización vacuolar de PIN2 (**Figura 12B**). Sin embargo, como se muestra en la **Figura 16B**, este mismo tratamiento con Sortin2 pero post inducción de los cuerpos de BFA, logra inducir localización de PIN2 en vacuola (flecha azul) conjuntamente con localización en los cuerpos de BFA (flecha blanca). Esto sugiere que PIN2 efectivamente es removido desde los cuerpos de BFA. Es más, al extender los tiempos de tratamiento a 4 hrs (**Figura 16D**) observamos localización de PIN2 en vacuola y ausencia de PIN2 en los cuerpos de BFA. Esta disminución en el tiempo que toma observar PIN2 acumulado en vacuola (de 6 a 4 hrs), corrobora que el tráfico de PIN2 hacia la vacuola proviene desde los cuerpos de BFA, ya que, estos compartimentos inducidos por BFA, están celularmente más cerca en la ruta de internalización que la membrana plasmática.

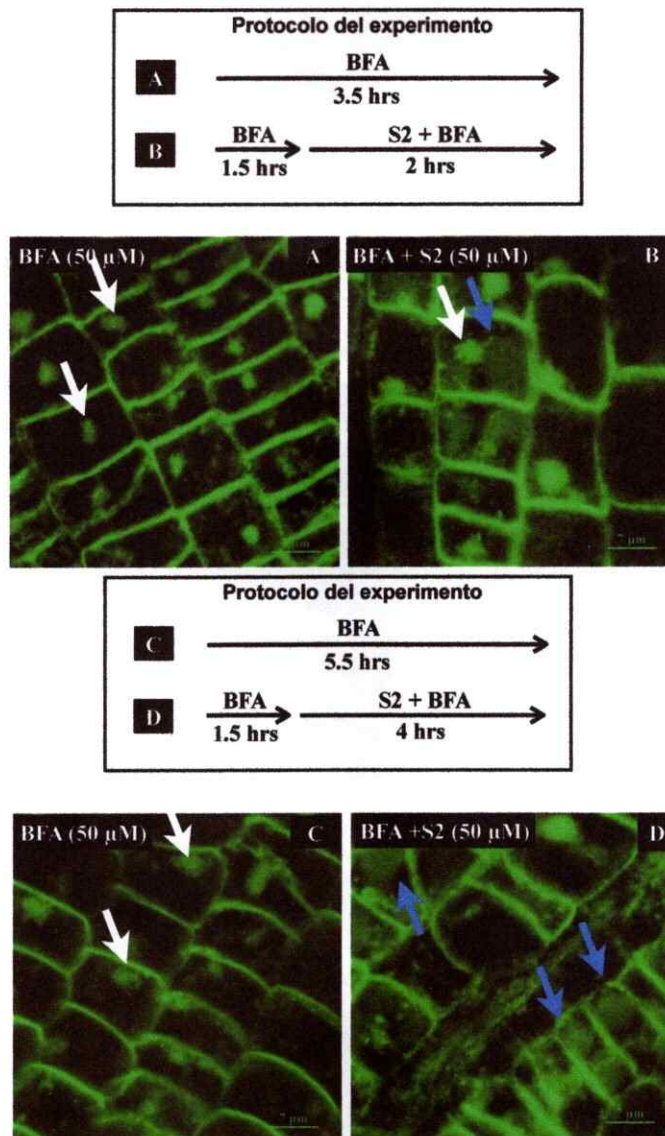


Figura 16. **Sortin2 antagoniza el efecto de Brefeldina A destinando la proteína PIN2 desde los cuerpos de BFA hacia la vacuola.** Plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP fueron crecidas por 7 días en MSC y luego sometidas a los tratamientos según los protocolos descritos sobre las imágenes. (A) Tratamiento durante 3,5 hrs con BFA como control del experimento en B. Se observa la acumulación de PIN2:GFP en los cuerpos de BFA (flechas blancas) (B) Tratamiento con Sortin2 durante 2 horas, después de un pre tratamiento con BFA por 1.5 hrs, induce la acumulación de PIN2:GFP en vacuola (flecha azul) y además se observa en los cuerpos de BFA (flecha blanca) (C) Tratamiento durante 3,5 hrs con BFA como control del experimento en D. Se observa la acumulación de PIN2:GFP en los cuerpos de BFA (flechas blancas). (D) Tratamientos con Sortin2 por 4 hrs, luego de la incorporación de PIN2:GFP a los cuerpos de BFA, desagregan la presencia de PIN2:GFP de los cuerpos de BFA observándose localización de PIN2 solamente en vacuola (flechas azules). El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad.

3.10 Sortin2 requiere de un compartimento pre-vacuolar y de un citoesqueleto de actina funcional

Estímulos como la oscuridad pueden destinar al transportador de auxina PIN2 a vacuola lítica y de esta manera controlar la cantidad de proteína disponible en la membrana plasmática (Laxmi y Col., 2009). Este tráfico requiere de la funcionalidad del compartimento pre-vacuolar y del citoesqueleto, ya que usando al inhibidor de tráfico de PVC a vacuola, wortmanina (Wm), y el despolimerizador de filamentos de actina, Latrunculina B (LatB), se inhibe el efecto de la oscuridad. Para analizar si es que el tráfico de PIN2 inducido por Sortin2 usa la vía de tráfico inducida por oscuridad se realizaron cotratamientos con Wm ó LatB junto con Sortin2. Tanto Wm como LatB son capaces de inhibir la acumulación de PIN2 en la vacuola, inducida por Sortin2 (**Figura 17C,F**). Lo mismo ha sido descrito para la inducción de PIN2 en la vacuola inducido por oscuridad. En ambos casos, inducido por Sortin2 y/o por oscuridad, PIN2 logra internalizarse parcialmente, a pesar de la presencia de las drogas Wm ó LatB, formando agregaciones intracelulares como las observadas en la **Figura 17C,F** (Kleine-Vehn y Col., 2008). Como ha sido descrito, Wm ni LatB, son drogas que producen acumulación de PIN2 en la vacuola (Kleine-Vehn y Col., 2008), ya que ésta se observa localizada en arresto en membrana plasmática (**Figura 17B,E**).

Con estos resultados comprobamos que el tráfico de PIN2 hacia la vacuola, inducido por Sortin2, utiliza los mismos componentes celulares que cuando trafica inducido por estímulos de oscuridad. Los estímulos de oscuridad inducen tráfico de PIN2 a vacuola para regular los niveles de proteína en la membrana plasmática. Esta observación plantea la interrogante si es que Sortin2 logra una mayor acumulación de PIN2 en vacuola, porque altera la maquinaria de tráfico de la proteína ó porque está

induciendo un exceso de proteína en la membrana plasmática, el que la célula requiere degradar usando la vía de destinación de PIN2 a vacuola.

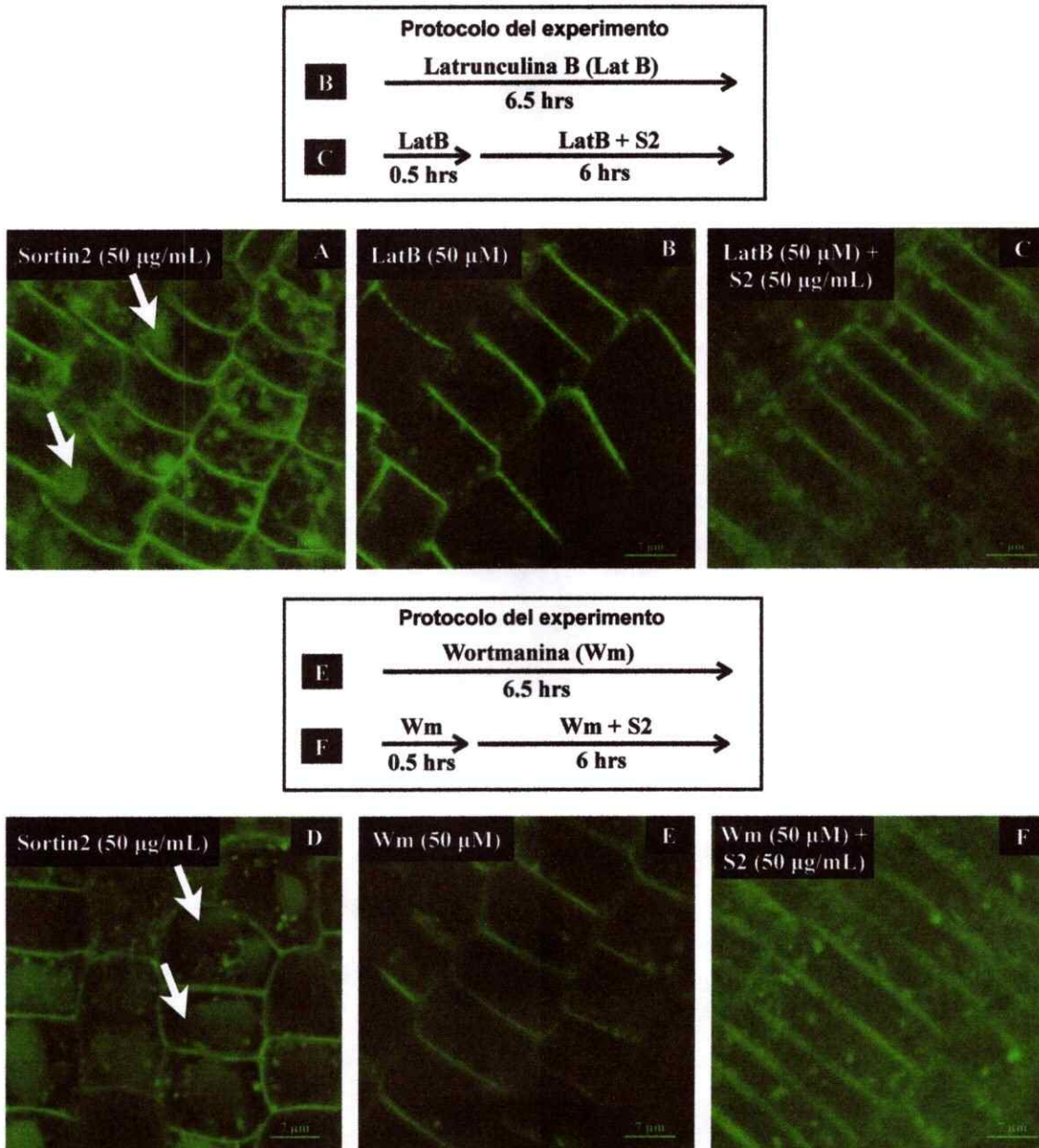


Figura 17. La destinación de PIN2 hacia la vacuola, por efecto de Sortin2, requiere de que el citoesqueleto y el tráfico PVC-vacuola sean funcionales. Plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP fueron crecidas por 7 días en MSC y luego sometidas a los tratamientos según los protocolos descritos sobre las imágenes. (A,D) Los tratamientos control corresponden a 6.5 horas en MLC. (A) Luego de 6 hrs de tratamiento con Sortin2, PIN2 se localiza en la vacuola (flechas blanca). La localización vacuolar de PIN2 causada por Sortin2 es inhibida por la acción de la droga Lat B. (B) El inhibidor del tráfico vesicular PVC-vacuola Wortmanina inhibe la acumulación de

PIN2 en la vacuola inducida por el tratamiento con Sortin2 durante 6 hrs. El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad.

3.11 Sortin2 no altera los niveles de transcrito de PIN2

Para comprobar que el efecto de Sortin2, en la destinación de PIN2 desde la membrana plasmática a la vacuola, no está asociado a un incremento de los niveles de PIN2 en la célula, se utilizó RT-PCR semicuantitativo. Se analizaron los niveles de transcrito de PIN2 de plantas incubadas en tratamientos idénticos a los usados para la visualización de la acumulación de PIN2:GFP en la vacuola. Para esto se usaron plantas silvestres sometidas a tratamientos en MLC con Sortin2 50 µg/mL y se compararon con plantas tratadas en ausencia de Sortin2.

En la **Figura 18A,B** se observan los resultados de la determinación del número de ciclos necesario para la amplificación de los genes PIN2 y actina. Se muestra la electroforesis de los productos de amplificación de PIN2 y del gen de actina que se usará como control de carga (**Figura 18A**). Las gráficas muestran la cuantificación de los productos de amplificación, señalando, con una flecha roja, el número de ciclos del PCR seleccionado que permitirá cuantificar la expresión de los genes (**Figura 18B**). El procedimiento se realizó para las muestras control a las 0 y 6 hrs en MLC (M0 y M6, respectivamente). Los resultados obtenidos son idénticos para M0 y M6 indicando que el tratamiento control no altera la expresión ni de actina ni de PIN2. Se escogió 32 ciclos para amplificar el transcrito de PIN2 y 25 ciclos para la amplificación del transcrito de actina (gen normalizador).

En la electroforesis del RT-PCR, se puede apreciar bandas de alrededor de 900 pb, lo que corresponde a lo esperado para el producto amplificado de PIN2 y que no presentan variaciones en la abundancia al ser tratadas por 0, 2, 4, 6 hrs en MLC con

Sortin2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S0, S2, S4, S6) (**Figura 18C**). Lo mismo ocurre al analizar las plántulas sometidas a los tratamientos en ausencia de Sortin2 (M0, M2, M4, M6). El control de carga usado es el gen constitutivo que codifica para la proteína actina. Los niveles de amplificado de PIN2 fueron cuantificados por densitometría usando el programa ImageJ normalizando los valores por los niveles de amplificado de actina usando la misma cantidad de cDNA templado. En la **Figura 18D** se observa la gráfica que muestra los valores normalizados del nivel de transcrito de PIN2 para las condiciones control y Sortin2. Estos valores no muestran una diferencia significativa para ninguna de las condiciones analizadas. Este resultado indica que Sortin2 no produce una variación en la cantidad de transcrito de PIN2 en los tratamientos con los cuales se observa acumulación de PIN2:GFP en la vacuola. Esto sugiere que la localización de PIN2 en vacuola, que se observa bajo tratamientos con Sortin2, no es una respuesta celular a un efecto del químico sobre los niveles del gen.

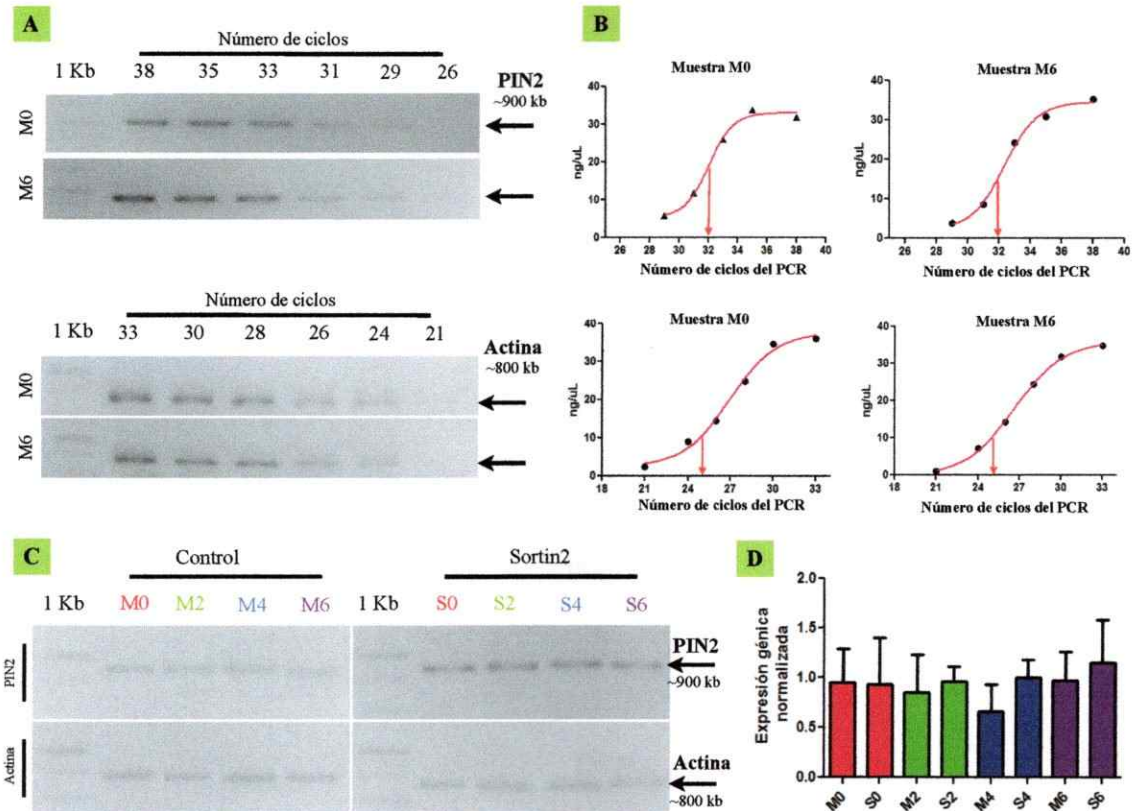


Figura 18. **Sortin2 no altera los niveles de expresión de PIN2.** Plántulas tipo silvestre fueron crecidas por 7 días en MSC ($n=15$) y luego sometidas a los tratamientos Control (M) y Sortin2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S) en MLC durante 0, 2, 4 y 6 hrs. Se extrajo RNA y se preparó cDNA para cada muestra utilizando la misma concentración de RNA en todos los casos. Se realizaron reacciones de PCR amplificando el gen PIN2 y como control de carga el gen de actina. **(A)** PCR con gradiente del número de ciclos amplificando PIN2 y actina para las muestras M0 y M6. **(B)** Curvas de concentración del amplificado versus el número de ciclos del PCR. El punto de inflexión de la curva se denota con una flecha y corresponde a 32 ciclos para PIN2 y 25 para actina. **(C)** Separación por electroforesis de los productos del RT-PCR. Se amplificó PIN2 y actina para cada una de las distintas muestras (0, 2, 4 y 6 hrs). **(D)** Niveles de transcritos de PIN2, en tratamientos con Sortin2, normalizados con respecto al gen constitutivo actina. Las desviaciones estándar son el resultado de 3 replicas técnicas. Se realizó una replica experimental para los tratamientos M6 y S6.

3.12 Sortin2 altera selectivamente la localización de PIN1 según el tipo de raíz.

PIN1 es otro miembro de la familia PIN de transportadores de auxina. Su importancia en el establecimiento de un correcto desarrollo en plantas ha sido tan estudiado como el de PIN2 (Zhang y Col., 2010, Jaillais y Col., 2006, Cheng y Col., 2007). Tratamientos con Sortin2 alteran la localización de PIN1:GFP e induce la aparición de raíces adventicias que son aquellas que no nacen de la radícula del embrión sino de cualquier otra parte de la planta como el hipocótilo en este caso (Pérez, 2009). Para analizar cómo se relacionan estos fenómenos se germinaron plántulas de la línea PIN1:GFP en Sortin2 y se observó la localización de PIN1 con microscopia confocal. En condiciones control PIN1 se observa en la membrana plasmática de células de la zona de la vasculatura (**Figura 19A,B**). Al observar las imágenes de plantas germinadas en presencia de Sortin2, se observa que Sortin2 altera la morfología de la planta, presentando una raíz principal arrestada, mientras que a la vez un par de raíces adventicias desarrolladas normalmente (**Figura 19C**). También se evidencia que la localización de PIN1 en raíces adventicias (**Figura 19E,F**) está menos afectada que la localización de PIN1 en la raíz principal (**Figura 19D**).

Considerando que la señalización hormonal de la auxina es crucial para la organogénesis, la alteración de la localización de los transportadores de auxina podría estar explicando la drástica detención del desarrollo que se observa en la raíz principal cuando las plántulas son germinadas con Sortin2.

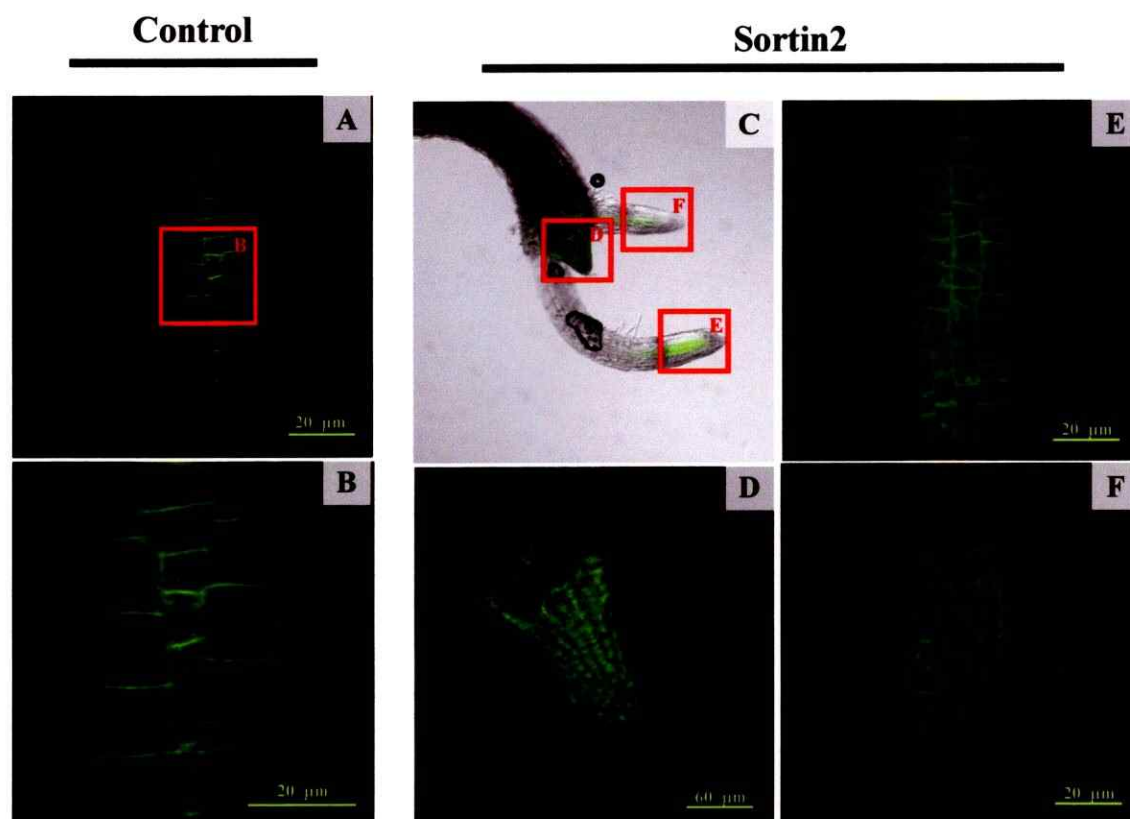


Figura 19. Sortin2 discrimina entre raíz principal y raíz adventicias en términos de la localización de PIN1. Plántulas de la línea transgénica PIN1:GFP fueron germinadas en MSC con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego analizadas con microscopía confocal. (A) microscopía de una planta PIN1:GFP en la zona vascular donde se expresa PIN1 (B) Amplificación de A mostrando que, como ha sido reportado, la localización de PIN1 en la raíz principal de plantas control es en membrana plasmática. (C) Microscopía representativa de una planta crecida en presencia de Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se observa una raíz principal arrestada [D] y raíces adventicias [E,F]. (D) Amplificación de la raíz principal que se muestra en C. Por efecto de Sortin2, la localización de PIN1 en esta raíz principal, no se distingue en membrana plasmática. (E,F) Amplificación de la raíces adventicias que se muestra en C. PIN1 se observa internalizado, pero también en membrana plasmática. El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad.

3.13 Sortin2 altera procesos fisiológicos relacionados con auxina.

El desarrollo de las plantas está principalmente comandado por la acción de hormonas entre las que destacan la auxina. La hormona auxina participa en diversos procesos fisiológicos. Entre los más importantes se encuentran el crecimiento, los tropismos y la organogénesis (Delker y Col., 2008). El análisis del fenotipo de plántulas crecidas en presencia de Sortin2 revelaron que estos procesos fisiológicos se ven

alterados (Pérez, 2009). Para descartar que el efecto de Sortin2 es sobre el desarrollo en estadios tempranos de la planta, se evaluó la acción de Sortin2 sobre plántulas de 7 días. Se analizó: 1) el efecto de Sortin2 sobre el crecimiento de la raíz principal y 2) la capacidad de este órgano de reorientarse frente a estímulos gravitropicos (geotropismo). Para esto se crecieron verticalmente plántulas tipo silvestre durante 7 días y luego fueron trasladadas a medio fresco con Sortin2. El estímulo gravitropico consiste en voltear las placas de tratamiento en 90° y así disponer las plántulas de manera horizontal.

Como se observa en la **Figura 20A** tanto las plántulas controles (DMSO) como las tratadas con Sortin2 (S2) presentan un crecimiento de la raíz principal. Sin embargo, es notorio que la raíz principal de plántulas tratadas con Sortin2 presentan dos características: 1) crecen menos y 2) se desorientan respecto al vector de gravedad. La cuantificación del largo de la raíz principal (**Figura 20C**) muestra que las plántulas tratadas con Sortin2 tienen un largo de la raíz principal de entre 20-30 mm, mientras que las plantas controles presentan una largo de la raíz principal por sobre los 50 mm.

Cuando las plántulas son estimuladas gravitropicamente al momento de trasladarlas a las placas de tratamiento, podemos observar que la punta de la raíz de las plántulas en tratamiento control se reorientan curvándose y creciendo alineados al vector de gravedad. Sin embargo, la plantas tratadas con Sortin2 presentan raíces principales que crecen pero que no se reorientan (**Figura 20D**). La cuantificación de los ángulos de curvatura de la raíz (**Figura 20E**) nos muestra que hay una alta frecuencia de plantas Control (DMSO 1%) que se reorientan con ángulo en torno a los 90° de curvatura. En cambio, la gran mayoría de las plantas tratadas con Sortin2 25 y 50 µg/mL presentan una distribución de los ángulos de curvaturas, entre 90° y 270°. Esto

implica que hay una gran disfunción, causada por Sortin2, de los procesos fisiológicos que determinan el proceso fisiológico de reorientación gravitrópica.

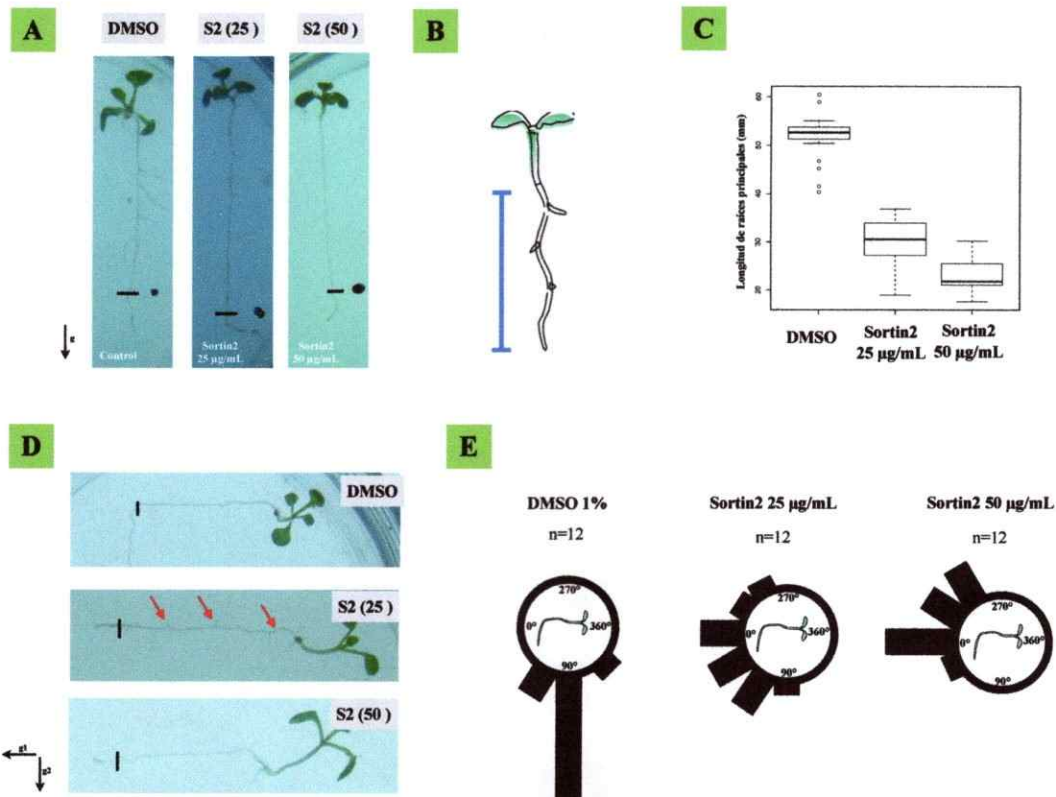


Figura 20. **Sortin2 inhibe el crecimiento de la raíz principal y la reorientación gravitrópica.** Plántulas tipo silvestre de 7 días fueron trasladadas a placas de tratamiento control (DMSO), Sortin2 25 µg/mL (S2 (25)) y 50 µg/mL (S2 (50)) y analizadas después de 4 días. El crecimiento de la raíz antes del traslado a placas de tratamiento se encuentra señalado con la línea negra. (A,B,C) Tratamiento por 4 días dispuestas verticalmente (D,E) Tratamiento por 4 días dispuestas horizontalmente. (A) Imágenes representativas de las plantas crecidas hasta la línea negra y trasladadas hacia los distintos tratamientos. (B) Zona que se consideró para la cuantificación que se muestra en C. (C) Diagrama de cajas muestra la cuantificación de la longitud de la raíz principal para cada tratamiento en A. La línea horizontal negra en medio de la caja, corresponde a la mediana. (D) Imágenes representativas de las plantas crecidas hasta la línea negra y trasladadas hacia los distintos tratamientos y dispuestas en 90° (ensayos de respuesta gravitrópica). (E) Cuantificación del ángulo de curvatura de la raíz (α) principal de plantas estimuladas gravitropicamente en D. El gráfico esquematiza la frecuencia de ocurrencia para cada uno de los 6 rangos de 30°.

3.14 Sortin2 inhibe la degradación diferencial de PIN2

La curvatura de la punta de la raíz frente al estímulo gravitropico es un proceso regulado principalmente por la hormona auxina provocando una elongación diferencial en las células del meristema de la raíz. La reorientación gravitropica requiere una distribución asimétrica de la hormona auxina y depende de la actividad de los transportadores de auxina (Abas y Col., 2006; Kleine-Vehn y Col., 2008; Vanneste y Friml, 2009). Se ha demostrado que con la participación combinada de tráfico vesicular y actividad del proteosoma se controla la degradación diferencial de PIN2 en plantas graviestimuladas. Para analizar si es que la alteración de Sortin2 en el tráfico de PIN2 altera la degradación diferencial del transportador, se trataron plantas de la línea PIN2:GFP y se estimularon gravitropicamente en presencia de Sortin2. Cuando se observa la intensidad de fluorescencia de PIN2:GFP en la punta de la raíz de plantas gravi-estimuladas en ausencia de Sortin2 (**Figura 21A**) se logra identificar una mayor intensidad de fluorescencia en las células de la cara inferior de la raíz (**Figura 21C**), producto de una mayor degradación en las células de la cara superior como se ha descrito (Kleine-Vehn., 2008). En presencia de Sortin2, en cambio, los niveles de PIN2 se observan relativamente similares al comparar la capa superior e inferior de la raíz (**Figura 21B**). Aplicando una escala de intensidad de fluorescencia para estas imágenes podemos observar además, que en tratamientos con Sortin2 los niveles de PIN2 son menores que en condiciones control (**Figura 21D**). Esto concuerda con el efecto antes descrito de Sortin2 como inductor de la degradación de PIN2. Un diagrama de superficie de estas imágenes nos permite reconocer más fácilmente los niveles de PIN2 (intensidad de fluorescencia) y con esto identificar que en tratamientos con Sortin2 los niveles son menores que en Control (menor abundancia de picos blancos) y no muestran notables diferencias entre las caras superior e inferior de la raíz (**Figura 21F**). En condiciones control, como es esperado, la abundancia de picos

blancos es mayor en la cara donde se produce menos degradación, la cara inferior (Figura 21E). Los diagramas de superficie son, entonces, una gráfica y fácil manera de observar la degradación diferencial de PIN2 en el proceso de reorientación gravitrópica de la punta de la raíz.

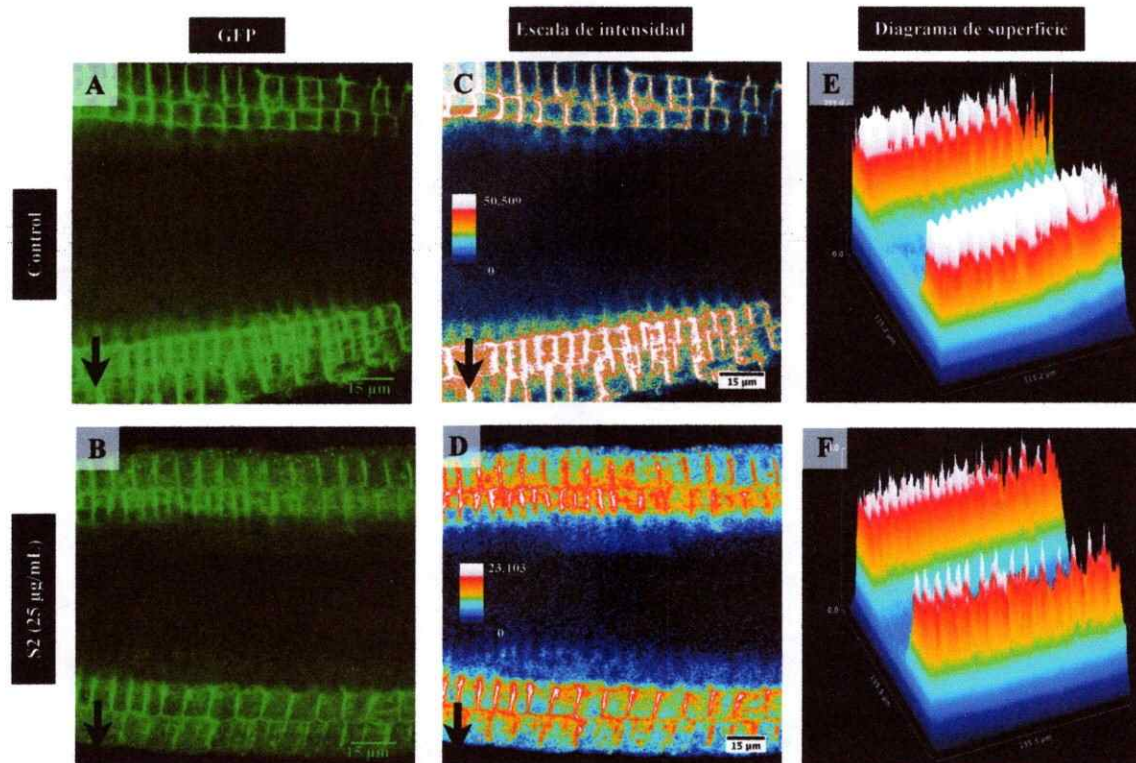


Figura 21. **Sortin2 inhibe la degradación diferencial de PIN2.** Plántulas PIN2:GFP de 7 días crecidas verticalmente fueron trasladadas a placas de tratamiento control y Sortin2 25 µg/mL y analizadas después de 3 horas. Durante esas 3 horas las plantas fueron dispuestas en oscuridad y volteadas en 90° con respecto al vector de gravedad. (A,C,E) Ensayo en condiciones controles (B,D,F) Ensayo en presencia de Sortin2. (A,B) Microscopía confocal, captando la fluorescencia de PIN2:GFP, de la punta de la raíz principal de plantas estimuladas gravitropicamente en condición control (A) y en presencia de Sortin2 (B). (C,D) Fluorescencia en una escala de intensidad de las imágenes en A y B, respectivamente. Con esto se puede apreciar más clara la diferencia entre los niveles de PIN2 entre las caras superior e inferior. Nótese que las unidades de fluorescencia son mayores en las condiciones control. (E,F) Diagramas de superficie de las imágenes en A y B, respectivamente. Con esto se puede distinguir los niveles de fluorescencia PIN2:GFP de una manera 3D (picos blancos). En condición control (E), los picos blancos son más intensos en la cara inferior. No se observan estas diferencias en el diagrama del tratamiento con Sortin2 (F). El experimento se repitió 2 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad

3.15 Sortin2 no altera la señalización de auxina a nivel del complejo receptor de auxina

La señalización de auxina contempla tanto el transporte de la hormona a través del sistema de transporte célula a célula mediado por transportadores, como la recepción de la hormona por un receptor nuclear soluble. Este complejo receptor ha sido identificado como el SCF^{TIR} (proteína Skp1–Cullin–F-box, Dharmasiri y Col., 2003) y está modulado por diferentes proteínas (Paciorek y Friml, 2006). Uno de estos moduladores primeramente descritos y más importante es AXR1 (Leyse y Col., 1993, Lincoln y Col., 1990). Para analizar si el efecto de Sortin2 en la señalización es a nivel del receptor soluble de la auxina, se analizó el fenotipo de plantas mutantes para el modulador del receptor de auxina AXR1 frente a tratamientos con Sortin2.

Como se observa en la **Figura 22A** la línea mutante *axr1-12* presenta el mismo fenotipo que las plantas silvestre al ser tratadas con Sortin2: 1) inhibición del crecimiento de la raíz principal y 2) pérdida de gravitropismo. La raíces de las plantas *axr1-12* son capaces de crecer al ser tratadas con Sortin2 (flecha azul), pero a una tasa mucho menor que en condiciones Control. Sin embargo, en presencia de Sortin2 25 µg/mL, la raíz no se reorienta al graviestimarlas (**Figura 22A**, *axr1-12*). Esto indica que la presencia de AXR1 no es requerida para observar los efectos a nivel fenotípico de Sortin2.

En el análisis de las plantas se observa una presencia, considerablemente mayor, de raíces laterales en las plantas tratadas con Sortin2 25 µg/mL. Para cuantificar estos resultados se decidió, entonces, analizar tres parámetros fenotípicos: 1) longitud de la raíz principal (LRP) 2) el número de raíces laterales (NRL) y 3) la longitud de las raíces laterales (LRL). Al cuantificar esto notamos que tanto las plantas silvestre como las mutantes *axr1-12* presentan, en presencia de Sortin2, una significativa disminución de la LRP (**Figura 22B**). El parámetro LRL, sin embargo, no

presenta significativas diferencias, tanto en silvestre como mutante, entre los tratamientos, a pesar de mostrar una menor dispersión de los datos en presencia de Sortin2 (Figura 22B). Este efecto selectivo de Sortin2 sobre el crecimiento de las raíces de la planta es coherente con el efecto diferencial de Sortin2 al analizar la localización de PIN1 (ver sección 3.11).

En plantas silvestres, el NRL aumenta en Sortin2 25 µg/ml en por lo menos 5 veces respecto al control silvestre (Figura 22B). Sorprendentemente, en la línea mutante *axr1-12* este parámetro aumento aproximadamente 4 veces, en relación a la control silvestre. Dado que las plantas mutantes y las silvestres se comportan de la misma manera frente a Sortin2, en términos del parámetro NRL, sería indicativo de que el producto génico AXR1 no es el blanco molecular de Sortin2, sino que algún componente río arriba en la señalización de la hormona auxina.

Con la comparación de fenotipos entre planta silvestre y mutante, hemos encontrado evidencia que apoyan que el efecto de Sortin2 no es sobre la señalización intracelular de auxina, sino sobre procesos previos como el flujo de la hormona a través de los tejidos, el que está mediado por los transportadores PIN.

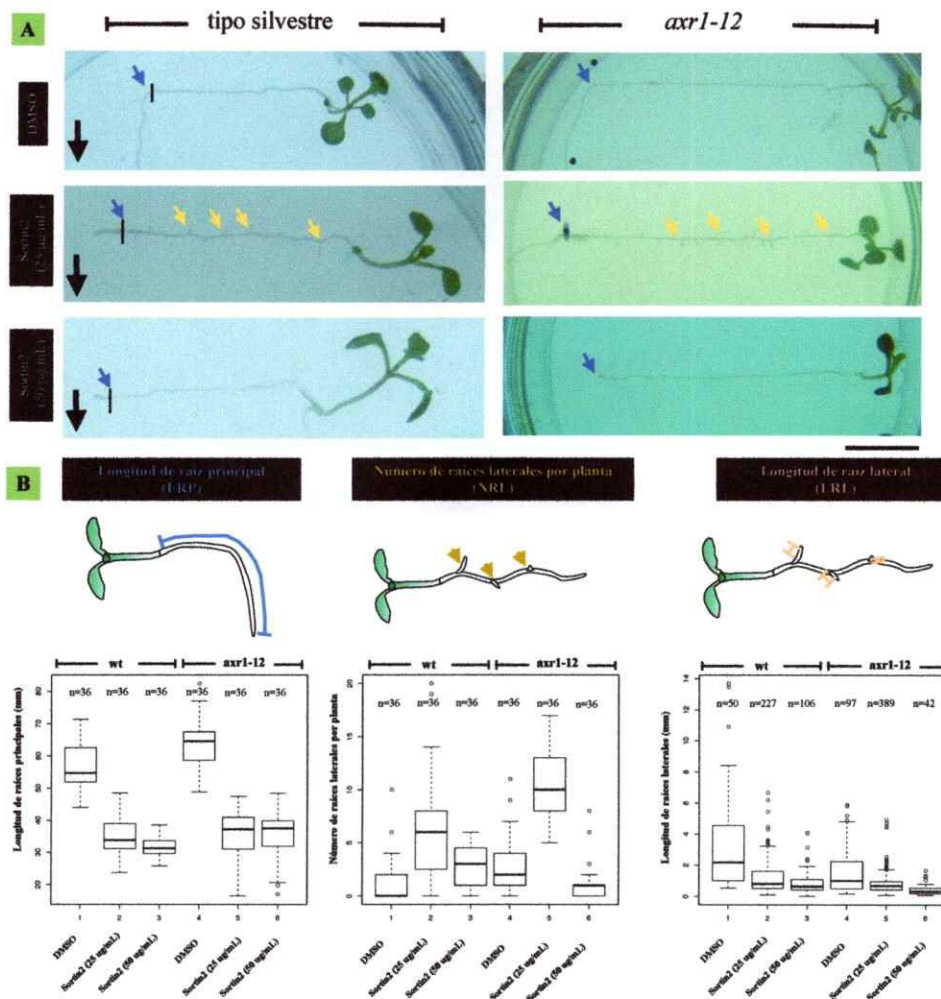


Figura 22. La línea *knock out axr1-12* es sensible a Sortin2 al igual que la planta silvestre. Plántulas silvestre y mutante *axr1-12* de 7 días crecidas verticalmente fueron trasladadas a placas de tratamiento Control y Sortin2 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Las placas fueron volteadas en 90° con respecto al vector de gravedad y analizadas después de 4 días. **(A)** Tanto las plantas silvestre (wt) como la línea *axr1-12* al ser graviestimuladas, son incapaces de reorientarse gravitropicamente. A 25 $\mu\text{g/mL}$ se observa el evidente aumento de ocurrencia de raíces laterales (flechas amarillas). Las flechas azules indican el tamaño de las plantas antes de ser trasladadas a las placas de tratamiento. **(B)** Cuantificación del largo de la raíz principal (LRP), del número de raíces laterales (NRL) y de la longitud de la raíz lateral (LRL). Los valores se presentan en diagramas de cajas, donde el 50% de los datos están dentro de las cajas blancas y la barra negra horizontal representa a la mediana de los datos. Los parámetros varían de la misma forma tanto en las plantas silvestres como en la línea mutante. La LRP disminuye con la presencia de Sortin2, mientras que el NRL tiene un incremento de al menos 5 veces en Sortin2 25 $\mu\text{g/mL}$. La LRL tiene tendencia a disminuir con la presencia de Sortin2, sin embargo, no hay diferencias significativas. Se usó el test estadístico ANOVA con $p < 0.05$ y "n" variado según el número de raíces laterales que se presentan en cada condición.

3.16 Sortin2 no altera la estabilidad de la proteína AXR3, miembro de la familia de proteínas represoras AUX/IAA.

Dentro de la señalización intracelular de auxina se ha demostrado que diversos procesos moleculares son requeridos para que la señal de la auxina se traduzca en un cambio fisiológico. El receptor nuclear soluble de la auxina SCF^{TIR} juega un papel fundamental, ya que permite la degradación mediada por proteosoma de los represores de los factores de transcripción ARF. El represor AXR3, miembro de la familia AUX/IAA, es ubiquitinado por el complejo SCF^{TIR}-Auxina y luego degradado de manera de activar a los ARF (Mockaitis y Estelle, 2008). Para comprobar que el efecto de Sortin2 no es sobre la estabilidad de AXR3, se analizó la tasa de degradación de este represor nuclear en presencia de auxina exógena y en presencia de Sortin2.

Para esto se usó la línea transgénica HS::AXR3:GUS (Gray y Col., 2001). Esta línea contiene un promotor HS inducible por temperatura (37°C) y la fusión de AXR3 a un reportero. El reportero de AXR3 es la enzima β -glucuronidasa codificada por GUS. La presencia de la proteína AXR3 se detecta indirectamente con la actividad de la enzima codificada por GUS. Esta enzima puede hidrolizar sustratos comerciales como X-Gluc generando coloración azul (ensayo histoquímico), así como el sustrato MUG produciendo un producto fluorescente MU (ensayo fluorométrico). Mediante ensayo histoquímico se comprobó que el tiempo de inducción (2 hrs) utilizado (Gray y Col., 2001; Hayashi y Col., 2003) es suficiente para inducir la expresión del transgen AXR3:GUS (Figura 23B).

Para la cuantificación de la actividad de la enzima codificada por GUS, se usa el ensayo fluorométrico. Primero, para descartar la saturación de la reacción, se comprobó la linealidad de la reacción enzimática de GUS (Figura 23A), para distintas

cantidades de proteína total. Luego, se decidió trabajar con la cantidad de proteínas totales cuya curva de reacción enzimática tiene un mejor ajuste lineal.

En la **Figura 23C**, se observa la actividad de GUS en tiempos posteriores a la inducción por calor: DMSO 1% (Control), Auxina 10 μM y Sortin2 50 $\mu\text{g/mL}$. Como es de esperar, en presencia de auxina la actividad de GUS decae con el tiempo por la acción del complejo SCT^{TIR}-Auxina que ubiquitina al represor AXR3. En presencia de Sortin2, sin embargo, la actividad de GUS se mantiene en torno a la actividad inicial, indicando que Sortin2 no se comporta como auxina y que no altera la estabilidad del represor AXR3. La condición control (DMSO 1%) comprueba que la degradación de AXR3 observada en la condición Auxina es producto de la interacción de la auxina con el receptor nuclear y no de las condiciones de tratamiento.

La estabilidad del represor AXR3 no se ve afectado por Sortin2 a diferencia de lo que hace auxina, comprobando que Sortin2 no se comporta como esta hormona. De manera que el efecto que genera Sortin2 en la planta es el resultado de eventos distintos a la degradación de los represores Aux/IAA. Estos resultados junto al comportamiento fenotípico de *axr1* apuntan a que Sortin2 no afecta la señalización intracelular de auxina, sino eventos río arriba de esta. Entonces, la deslocalización de los transportadores de auxina PIN explicarían los fenotipos a nivel de planta completa.

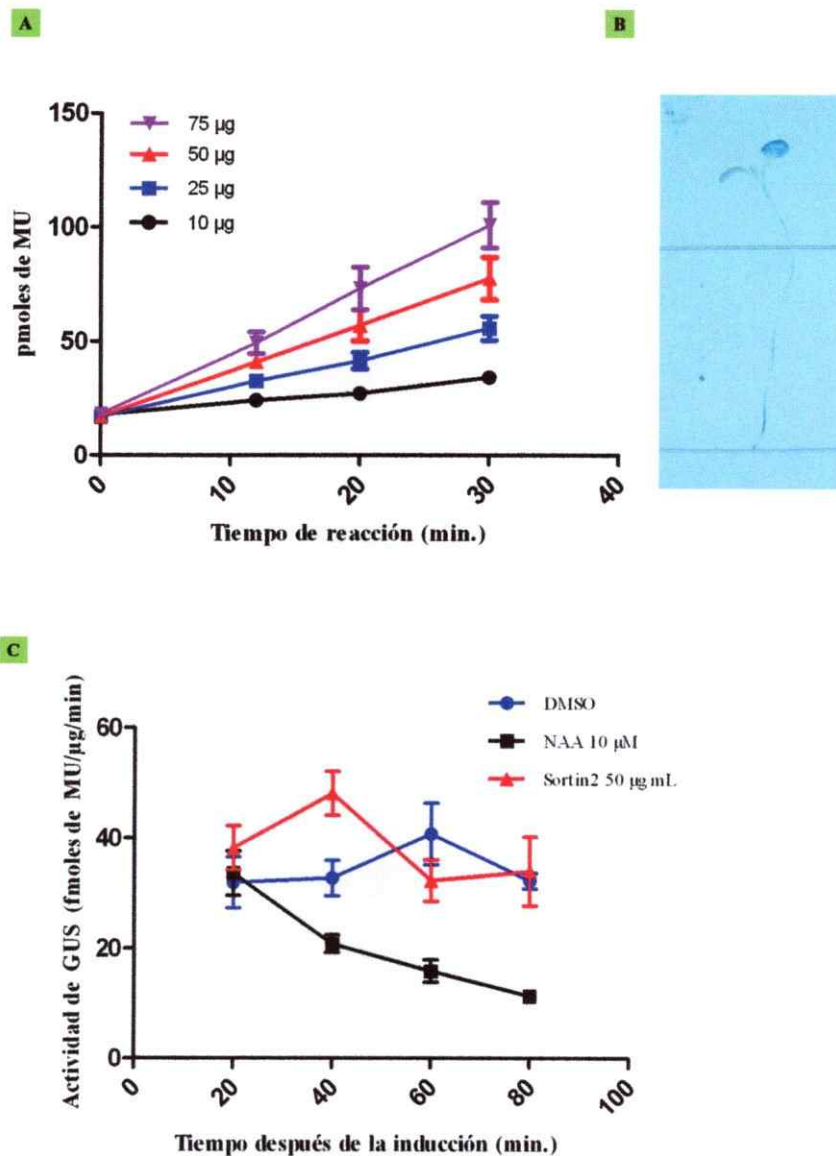


Figura 23. **Sortin2 no altera la tasa de degradación del represor de la señalización de auxinas AXR3.** Plántulas de 7 días de la línea HS:AXR3NT:GUS fueron sometidas a 37 °C por 2 horas para inducir la expresión del gen AXR3NT:GUS. (A) Se comprobó la linealidad de la actividad enzimática de GUS a distintas cantidades de proteínas totales desde extracto de plántulas inducidas. (B) Se corroboró la expresión del gen con un ensayo histoquímico de GUS. (C) La tasa de degradación de AXR3, medida por la actividad de GUS, no es alterada cuando las plantas son tratadas con Sortin2 post inducción a 37 °C. Se muestra el promedio y el error asociado de dos réplicas experimentales con sus respectivas réplicas técnicas.

DISCUSIÓN

4.1 Sortin2 altera la ruta endocítica del sistema de endomembranas

Diversas evidencias presentadas en esta tesis apoyan el efecto de Sortin2 sobre la ruta endocítica del sistema de endomembranas. Las más importantes son que Sortin2: 1) Acelera la internalización de un trazador de endocitosis 2) Induce acumulación de proteínas de membrana plasmática en vacuola y 3) Marcadores de componentes de la ruta endocítica son afectados.

Concordantemente mediante dos estrategias independientes, marcadores de compartimentos y drogas que alteren el sistema de endomembranas, encontramos que el blanco celular de Sortin2 podría estar río abajo de los endosomas tempranos (EE/TGN) y río arriba los endosomas tardíos (LE/PVC).

4.1.1 Internalización del trazador de endocitosis FM4-64

Sortin2 provoca que el trazador de endocitosis FM4-64 tarde la mitad del tiempo en traficar hasta el tonoplasto (**Figura 11**). Con este trazador se logró comprobar el efecto de Sortin2 sobre el proceso general de endocitosis, ya que FM4-64 es un marcador que no es selectivo para los distintos tipos de endocitosis (Bolte y Col., 2004). Esto implica que Sortin2 alteraría componentes o mecanismos de tráfico que son relativamente comunes en el tráfico vesicular endocítico. Sin embargo, este resultado contrasta con la capacidad que tiene Sortin2 en discriminar entre las vías de tráfico de los transportadores de auxina PIN1, PIN2, PIN7 y AUX1, ya que solo altera a PIN1 y PIN2, pero no altera AUX1 ni PIN7 (**Figura 6**). Este resultado implicaría que Sortin2 altera componentes específicos que son compartidos para el tráfico de PIN1 y PIN2. Esto concuerda con antecedentes de nuestro laboratorio, en donde se ha

identificado que la mutante de *S. cerevisiae* para el gen que codifica la cadena liviana de clatrina (*clc1*) es resistente al efecto de Sortin2. Además, se ha descrito que la internalización endocítica de PIN2 es dependiente de clatrina. Esto sugiere que el mecanismo molecular por el cuál Sortin2 induce la internalización de PIN2 a la vacuola podría involucrar endocitosis mediada por clatrina.

Dentro de las estrategias usadas actualmente para el análisis con FM4-64 se encuentran; análisis *in planta* y análisis en cultivos celulares vegetales como células BY-2, de tabaco. La estrategia usada en esta tesis, *in planta*, ha sido descrita como una mejor estrategia. Esto porque, al usar cultivos celulares se ha demostrado que a algunas concentraciones, las tinciones FM, como el FM4-64, tienen el potencial de perturbar la localización de proteínas integrales de membrana plasmática. Sin embargo, esto no ocurre cuando se utilizan análisis *in planta*, específicamente evaluando la localización de proteínas de membranas plasmática como PIN2 y PIP2A (Jelínková y Col., 2010). Dado que la localización de PIN2 y PIP2A también fue analizada en esta tesis, resultó ser de vital importancia el escoger una estrategia para analizar FM4-64 que no presente contradicciones con los experimentos realizados.

4.1.2 Uso del inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida (CHX)

La acumulación proteínas de membrana plasmática en vacuola, que Sortin2 induce, se podría deber tanto a proteína proveniente de la ruta secretoria (biosintética) como de la ruta endocítica. Se descartó la posibilidad de que la acumulación de PIN2 en vacuola se debiera al tráfico de proteína por la ruta secretoria, usando el inhibidor de síntesis proteico CHX. Esto porque, Sortin2 induce acumulación de PIN2 en vacuola aún en presencia de CHX (**Figura 13**), implicando que la proteína acumulada proviene

desde la membrana plasmática en donde había sido destinada previamente al tratamiento con CHX.

El tráfico de PIN2 a vacuola no es un fenómeno inusual en la planta, ya que frente a ciertos estímulos como la oscuridad, las células responden destinando a PIN2 a la vacuola (Laxmi y Col., 2008). Esto implica que Sortin2 produce su alteración gatillando una vía de tráfico que no es nueva y que es usada por las células frente a ciertas condiciones. Esta idea se refuerza con los requerimientos celulares que este tráfico posee. El tráfico de PIN2 a vacuola producido por oscuridad y por Sortin2 requieren de un citoesqueleto de actina como un tráfico PVC-vacuola funcional (Figura 17, Kleine-Vehn y Col., 2008)

La destinación de PIN2 a vacuola es un medio de control para el nivel de proteína celular. Por lo tanto el efecto de Sortin2 destinando PIN2 a vacuola podría estar ligado a un aumento de la abundancia celular del transportador. Esto, sin embargo, fue descartado, ya que el análisis de los niveles de transcrito de PIN2 revelaron que estos no se ven alterados por tratamientos con Sortin2 (Figura 18). Esto sugiere que la acumulación de PIN2 en vacuola, causada por Sortin2, no es producto de un exceso de transcripción de PIN2 en las células, sino, un efecto en el tráfico de esta proteína.

4.2 Identificación del blanco celular de Sortin2 en la ruta endocítica

4.2.1 Localización de proteínas marcadoras de la ruta endocítica

Antecedentes anteriores han mostrado que Sortin2 altera el tráfico de una proteína soluble, por la ruta secretoria, hacia la vacuola (Norambuena, resultados no publicados). Pero, Sortin2 además induce la localización de proteínas de membrana

plasmática, por la ruta endocítica, en vacuola, según resultados presentados en esta tesis. Interesantemente, existe un compartimento del SE en plantas que intersecta a esta dos rutas, endosoma temprano/TGN (Viotti y Col., 2010). Esos antecedentes plantearon que el efecto de Sortin2 podría estar río abajo de este compartimento compartido entre ruta secretoria y endocítica, EE/TGN. Los posibles candidatos como blanco celular para Sortin2 fueron compartimentos como los endosomas tardíos (LE/PVC) o vacuola o, incluso, en el tráfico que hay entre estos compartimentos. Esta idea se refuerza con antecedentes anteriores de nuestro laboratorio, donde se observó que la distribución de marcadores de compartimentos de la ruta secretoria (Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi), permanecen inalterados en tratamientos con Sortin2. Esta evidencia conjunta generaba un planteamiento teórica acerca del blanco celular de Sortin2 localizado entre EE/TGN y LE/PVC.

De manera muy interesante, cuando analizamos la localización de marcadores de compartimentos del SE encontramos que la localización del marcador de EE se produce normalmente indicando que los pasos previos a esta destinación no es alterada por Sortin2. Y, además, que el tráfico hacia los organelos mas tardíos como PVC y vacuola sí están alterados por Sortin2, ya que los marcadores de estos compartimentos mostraron una localización aberrante (**Figura 9**). Esta evidencia permitió comprobar que, calzando con lo planteado en base a antecedente previos, el blanco celular de Sortin2 estaría en componentes del tráfico entre EE/TGN y LE/PVC (ver Modelo en **Figura 24**).

En adición al planteamiento teórica y a la estrategia usando marcadores, existe una tercera evidencia que apoya blanco celular de Sortin2. Esta evidencia se basa en el uso de otras drogas que altera tráfico en el ES. Sortin2 causa desagregación de PIN2 acumulada en cuerpos de BFA. Dado que en estos cuerpos se encuentran agregados endosomas tempranos (EE) y endosomas de reciclaje (RE) (Dettmer y Col.,

2006; Robinson, Jiang y Schumacher, 2008), plausible proponer que el blanco esté río debajo de los EE/TGN. Además, coherentemente con lo observado con los marcadores de la ruta endocítica, el blanco celular de Sortin2 está río arriba de los endosomas tardíos, debido a que el efecto del Sortin2 sobre PIN2 requiere de un tráfico PVC-vacuola funcional, según los análisis con la droga wortmanina (ver Modelo en Figura 24 y Figura 17).

4.2.2 Drogas que alteran el tráfico de proteínas a través de la ruta endocítica

El beneficio del uso de Brefeldina A y Wortmanina para corroborar la propuesta de que Sortin2 altera el tráfico entre los endosomas tempranos tardíos, evidencia la importancia de contar con drogas cuyo blanco, al menos celular, sea conocido, de manera de poder establecer, mediante tratamientos en conjunto con ciertas drogas, nueva información referente al tráfico en el SE. En este contexto es una nueva droga con efectos celulares y posiblemente con blancos moleculares diferentes a las ya descritas es un aporte significativo.

Nuestros antecedentes muestran que este efecto de Sortin2 es distinto al causado por BFA. El blanco molecular de Brefeldina A es la proteína GNOM, involucrada en la formación vesicular (Geldner y Col., 2001). BFA actúa acumulando proteínas de membrana plasmática, que trafican vía endocitosis, intracelularmente en los llamados cuerpos de BFA. Sortin2, en cambio, destina la proteína PIN2, PIN1 y BRI1 a la vacuola. Esto sugiere fuertemente que el blanco molecular de Sortin2 no es/son el/los mismo/s que BFA.

El efecto de Sortin2 no solo es distinto del de BFA sino que también es río abajo que el de BFA. El hecho de que el efecto de BFA es inhibido en tratamientos con Sortin2, abre la posibilidad de que Sortin2 actúe como un inhibidor de endocitosis que

impide observar la acumulación de PIN2 en los cuerpos de BFA, en tratamientos de 2 horas (**Figura 14A**). Sin embargo, en los tratamientos más prolongados durante 6 horas, se comprobó que el efecto de Sortin2 es en eventos posteriores al efecto de BFA, ya que no se observa en los cuerpos de BFA por lo que induciría el tráfico de proteína PIN2 hacia vacuola (**Figura 16**).

Una segunda evidencia, aún mas conclusiva, apoya lo anterior. Esto es que Sortin2 logra desagregar la acumulación de PIN2 en los cuerpos preformados de BFA. Cuando se añadió Sortin2 en plantas con cuerpos de BFA se observó la una relocalización de PIN2 intracelular (**Figura 16A**). PIN2 se localiza, primero, en cuerpos de BFA y en vacuola, sugiriendo tráfico de proteínas desde un compartimento al otro y luego, en tratamientos más largos, se observó sólo acumulación de PIN2 en vacuola apoyando que la proteína acumulada en vacuola proviene de la acumulada en los cuerpos de BFA (**Figura 16B**). Es importante destacar el hecho de que la proteína PIN2 tomó menos tiempo, en acumularse en vacuola, en plantas pretratadas con BFA que en plantas no pretratadas, probablemente porque hay una mayor cercanía dentro de la ruta endocítica en el primer caso.

El efecto de Sortin2 no solo es distinto que el de BFA sino también diferente al de wortmanina. Wortmanina inhibe el tráfico desde LE/PVC a vacuola, mientras que Sortin2 altera el tráfico río arriba de LE/PVC. Esto es coherente con que wortmanina inhiba la acumulación de PIN2 en vacuola por efecto de Sortin2 (**Figura 17B**).

Cabe destacar que Sortin2 es una droga distinta a otras drogas cuyo efecto en el sistema de endomembranas ya ha sido descrito previamente. No hay otra droga que en plantas altere el tráfico acelerándolo, entre endosomas tempranos y tardíos. Además, en general, Sortin2 acelera el proceso endocítico a diferencia de todos los otros compuestos que la inhiben (Paciorek y Col., 2005).

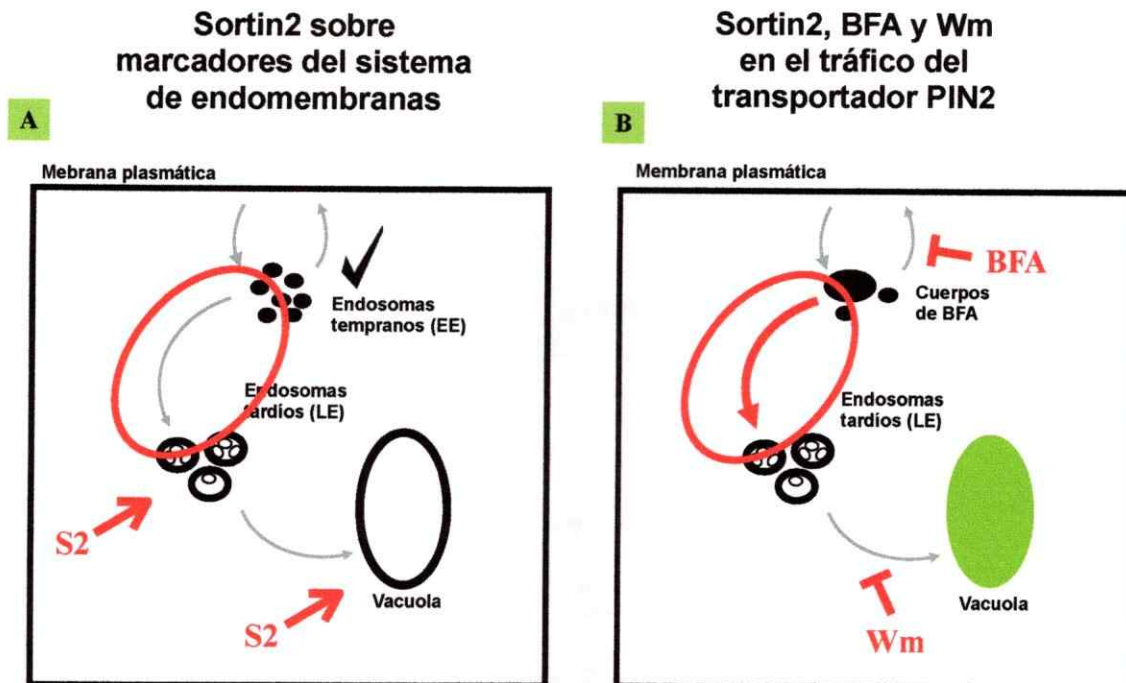


Figura 24. **Modelo del blanco celular de Sortin2.** (A) Sortin2 no altera la localización de los marcadores de endosomas tempranos (visto bueno), pero sí altera marcadores de endosomas tardíos y de vacuola (flecha roja). El blanco celular es localizado río abajo del organelo que no es afectado y río arriba de los organelos que son alterados por Sortin2 como está indicado con el círculo rojo. (B) Sortin2 induce tráfico de PIN2 por la ruta endocítica hacia vacuola. Aceleraría la llegada de PIN2 a vacuola desagregando los cuerpos de Brefeldina A (flecha roja) y por lo tanto su efecto estaría río abajo del blanco de Brefeldina A. Como el efecto de Sortin2 requiere del tráfico que es inhibido por Wortmanina (Wm), su blanco estaría localizado río arriba de Wm. El tráfico propuesto como el blanco celular de Sortin2 está entre los endosomas tempranos y los tardíos y coincide con el que se desprende del análisis con marcadores.

4.3 Sortin2 no altera la morfología ni funcionalidad del citoesqueleto

Se ha descrito que ciertas drogas que inhiben el transporte de auxina (ATI, *Auxin Transport Inhibitors*;) y que actúan como estabilizadores de actina alteran la localización de PIN1 (Geldner y Col., 2001, Dhonukshe y Col., 2008). Dado que Sortin2 también altera la localización de PIN1, se hizo necesario analizar el efecto de Sortin2 sobre el citoesqueleto para descartar que este efecto fuera una consecuencia indirecta de una alteración en el citoesqueleto.

Para el estudio de la morfología del citoesqueleto de actina, se ha usado clásicamente la proteína de fusión fimbrina:GFP. En este trabajo se usó la fusión de

GFP con uno de sus dos dominios de unión a actina (ABD2), porque es un marcador que entrega una menor fluorescencia *background* y es una mejor herramienta para el análisis de citoesqueleto de actina en células del meristema de la raíz (Wang y Col., 2004). Además, la distribución que presenta el marcador ABD2:GFP entrega mas información ya que permite observar claramente las fibrillas delgadas y gruesas de citoesqueleto de actina (Wang y Col., 2004)).

Sortin2 no provoca los efectos que han sido asociados a los estabilizadores del citoesqueleto de actina. Este tipo de drogas, que estabilizan al citoesqueleto, como Jasplakinolide y los ATI's, provocan un engrosamiento de los filamentos de actina (Dhonukshe y Col., 2008). La cuantificación del ancho de los filamentos de actina, marcados mediante ABD2:GFP, mostró que a diferencia de otras drogas, Sortin2 no provoca este fenotipo (**Figura 10B**). Además la distribución de estos filamentos en la célula se observaron normales en los tratamientos con Sortin2 indicando que este compuesto no alteraría los mecanismos de establecimiento de las fibrillas de actina y que el blanco molecular de Sortin2 no afectaría mecanismos de establecimiento del citoesqueleto.

No solo el establecimiento y morfología del citoesqueleto es importante en el trafico vesicular sino también su funcionalidad. Para estudiar la funcionalidad del citoesqueleto se observó el movimiento de organelos asistida por citoesqueleto (Loubéry y Col., 2008). Los tratamientos con Sortin2 no provocaron una alteración en el movimiento de los endosomas como si lo hicieron otras drogas, como Oryzalin y Latrunculina B, cuyo efecto es la depolimerización del citoesqueleto (**Figura 10C**). Esto indica que el blanco molecular de Sortin2 es distinto al de drogas depolimerizadoras de citoesqueleto, ya que no altera su funcionalidad.

La evidencia conjunta del análisis de la morfología y funcionalidad del citoesqueleto apoya la idea de que el efecto que Sortin2 tiene sobre la localización de las proteínas de membrana sería un efecto directo sobre el tráfico de estas y no una consecuencia de una irrupción en el citoesqueleto.

4.4 Características, ventajas, e importancia de Sortin2

Sortin2 presenta las características requeridas para el uso de drogas con fines en investigación en biología celular. El efecto de Sortin2 es inducible y muestra además una dosis dependencia (**Figura 12**). Adicionalmente, antecedentes previos en nuestro laboratorio, indican que el efecto de Sortin2 es reversible para los efectos fisiológicos que le ocasiona a las plantas tratadas. Todas estas características son requeridas para las drogas usadas en investigación, en especial en el estudio de tráfico del SE, porque entregan una mayor utilidad al momento de diseñar los experimentos. Por ejemplo, la inducibilidad, permite hacer análisis donde la condición inicial puede ser evaluada y estudiada y luego comparadas con la situación resultante del tratamiento. La dosis dependencia, es característica de una droga cuyo efecto es modulable y por lo tanto permite estudiar gradientes de severidad en los fenotipos analizados. Por último la reversibilidad, permite observar la pérdida de un determinado fenotipo si es que se retira de los tratamientos y además se pueden recuperar los organismos luego de los tratamientos si es requerido.

Otra característica muy ventajosa de Sortin2 es que su efecto es además selectivo logrando discriminar entre distintas vías de tráfico. Esto porque, en las mismas condiciones de tratamiento con Sortin2, se observó deslocalización de PIN1 y PIN2, pero no de AUX1 y PIN7 (**Figura 6**). Esta selectividad permite que Sortin2 pueda ser útil al momento de investigar vías de tráfico a través del SE. Esta selectividad de Sortin2 es coherente con los antecedentes de la literatura, ya que se ha demostrado

que el tráfico subcelular del transportador de influjo AUX1 usa una vía distinta de PIN1 (Kleine-Vehn y Col., 2006). El efecto de Sortin2 alteraría componentes distintivos que regulan el tráfico de estas dos proteínas, permitiendo discriminar entre dos vías de tráfico que han sido descritas como distintas.

La ausencia de efecto sobre el transportador de auxina PIN7 podría estar relacionado con la accesibilidad del químico a las células de la columela donde se expresa la proteína. Experimentos que permitan evaluar la accesibilidad que el químico posee a esos tejidos están considerados para la continuación de esta investigación. Sin embargo, estos resultados son coherente con lo descrito para otra droga como Endosifina1 (ES1) con la que se han detectado diferencias en el tráfico entre PIN7 y otras proteínas PIN (Robert y Col., 2008).

La importancia del efecto de Sortin2 para la planta, radica en que es una droga cuyo efecto tiene implicancias en su fisiología. La relocalización del transportador PIN2 a la vacuola, por ejemplo, es vital para la fisiología de la planta, ya que la vacuola lítica ha sido descrita como el lugar de degradación y de reciclaje de componentes celulares y por lo tanto, es importante para el desarrollo, senescencia e incluso para la muerte celular programada (Surpin y Raikhel, 2004). Dado que Sortin2 induce la destinación de PIN2 a la vacuola se vuelve relevante entender la relación de este fenómeno con los efectos fisiológicos de Sortin2; la inhibición del crecimiento de la raíz y la pérdida de orientación gravitrópica.

4.5 Sortin2 es distinto de otras drogas usadas para estudiar el sistema de endomembranas.

Ya hemos visto que Sortin2 actúa en un blanco celular distinto al drogas clásicamente usadas en biología celular como Brefeldina A y Wortmanina (ver sección 4.2.2). Pero además es distinto que otras drogas, recientemente descritas, como

Endosidina1 (ES1). ES1 también altera la localización ciertas proteínas de membrana plasmática como PIN2 y BRI1 (receptor de hormonas brasinosteroides, Roberts y Col., 2008). Sin embargo, solamente Sortin2, a diferencia de ES1, es capaz de inducir la internalización de otras proteínas de membrana plasmática como PIN1. Esto indicaría que Sortin2 es capaz de alterar selectivamente a la maquinaria de tráfico de PIN1 con respecto a otras proteínas como PIN2 y BRI1. Estas diferencias no son percibidas bajo el efecto de ES1, entregando una valiosa utilidad al uso de Sortin2 como una nueva droga en el estudio del SE.

Es distinto además de drogas que alteran el citoesqueleto como Latrunculina B (**Figura 17**) y Oryzalin (**Figura 10**). Eso posiciona a Sortin2 con un gran potencial para ser usado en investigaciones de biología celular.

4.6 Sortin2 y el desarrollo de la planta

4.6.1 Desarrollo de plantas mediado por un correcto tráfico vesicular

El efecto de Sortin2 en la plántulas crecidas en tratamiento parece ser más severo en la región subsuelo que en la parte aérea de la planta (Pérez, 2009). Esto podría estar indicando que los mecanismos celulares que se ven afectados por Sortin2 tienen mayor incidencia en el desarrollo de la raíz.

En el desarrollo de la raíz, se establecen procesos relacionados con la distribución de auxina (Macgregor y Col., 2008; Swarup y Col., 2008). Sortin2 afecta estos procesos en las plantas, ya que inhibe notablemente el crecimiento de la raíz principal, aumenta la ocurrencia de la raíz secundaria e inhibe la capacidad de reorientación gravitrópica de la raíz (**Figura 20 y 22**). Muchos de estos procesos fisiológicos de las plantas son mediados por eventos celulares a través del tráfico

subcelular de proteínas, como los transportadores de auxina, por el sistema de endomembranas.

Los procesos mediados por el SE se ejemplifican con Sortin2 al inducir la destinación de PIN2 a la vacuola, ya que esto inhibe la capacidad de la planta de sensor una nueva posición gravitrópica. La reorientación de la punta de la raíz es un proceso orquestado por el tráfico intracelular y la abundancia del transportador PIN2 en la parte superior e inferior de la raíz, permitiendo un flujo hormonal y una elongación celular diferencial (Abas y Col., 2006, Kleine-Vhen., 2008). Sortin2 inhibe la degradación diferencial del transportador PIN2 (**Figura 21**) explicando la pérdida de la reorientación gravitrópica de las plantas (**Figura 20**). Este alteración estaría dada por una destinación constitutiva de PIN2 a vacuola de degradación inducida por Sortin2, lo que torna a la punta de la raíz incapaz de responder a las señales que permiten la degradación diferencial del transportador.

No solo la localización y la actividad de PIN son importantes para el proceso de transporte de auxina, sino que también los niveles de degradación y síntesis de los transportadores. La posibilidad que Sortin2 inhibe la abundancia diferencial del transportador debido a efectos a nivel de la transcripción del transportador fue evaluada. Sortin2 no altera los niveles de PIN2 evaluados por medio de RT-PCR (**Figura 18**).

Sortin2 altera la localización del transportador PIN1 más severamente en la raíz principal que en las raíces adventicias (**Figura 19**), lo que correlaciona con que la ocurrencia de raíces adventicias es promovida en plantas crecidas en Sortin2 (Pérez, 2009). Estos resultados podrían explicar el incremento en el número de raíces laterales en plántulas expuestas a Sortin2, ya que la hormona auxina actúa como una señal de formación y desarrollo de las raíces laterales (Swarup y Col., 2008). Es probable que la

irrupción en el transporte de la auxina y una acumulación de ésta, provocada por Sortin2, sea el causante de una mayor aparición de raíces laterales.

4.6.2 Señalización intracelular de auxina

Sortin2 no tiene un efecto sobre la señalización intracelular de auxina. Aunque los efectos fisiológicos y celulares de Sortin2 están ligados por la importancia de la hormona auxina, hemos mostrado que son una consecuencia de los efectos río arriba de la señalización intracelular de la hormona (**Figura 22 y 23**).

Se descartó que Sortin2 altere la señalización intracelular de auxina por al menos dos tipos de evidencia. Primero, se registraron el mismo tipo de alteración fisiológica tanto en plantas silvestres como en líneas mutantes *axr1*. La proteína AXR1 participa en el primer paso de la señalización intracelular de auxina, ya que está encargada de activar al receptor SCF^{TIR}. Esto sugiere que los efectos de Sortin2 serían consecuencia de alteraciones río arriba de AXR1 en la señalización de la hormona auxina. Los efectos fisiológicos analizados fueron tres distintos tipos de procesos: el largo de la raíz principal, número de raíces laterales y longitud de la raíz lateral, lo que le da robustez al análisis realizado (**Figura 22**).

Un segundo tipo de evidencia proviene del estudio de la degradación de represores transcripcionales de la familia AUX/IAA, como AXR3. Auxina requiere de un segundo paso, en su señalización intracelular, el cual es la degradación de los represores de la familia AUX/IAA de la cual AXR3 es uno de sus miembros. Como se observó con la línea AXR3:GUS, la degradación de este represor no es un proceso que sea alterado por efecto de Sortin2, ya que la degradación del represor fue acelerada solo frente a tratamientos con auxina exógena (**Figura 23**).

Los resultados en su conjunto, con la mutante *axr1* y la línea transgénica AXR3:GUS, nos revela que Sortin2 interfiere la localización de los transportadores PIN

y esto sugiere que el proceso afectado es el transporte mediado por proteínas PIN de la auxina. Además el hecho de que Sortin2 no tiene la capacidad estimular la degradación de AXR3 nos indica que Sortin2 no actúa como una hormona auxina. Todos estos antecedentes refuerzan la idea de que el efecto de Sortin2 es único, distinto al de otras moléculas pequeñas, alterando el tráfico en el SE.

CONCLUSION

- Sortin2 altera la localización de proteínas de membrana plasmática destinándolas a vacuola. Este efecto es selectivo, ya que afecta solo a algunas proteínas.
- Sortin2 afecta la ruta endocítica porque acelera la endocitosis del trazador FM4-64 y destina a PIN2 a vacuola. Sortin2 induce el tráfico de PIN2 por la misma vía que usa bajo estímulos de oscuridad, ya que requiere de citoesqueleto de actina y tráfico LE/PVC-vacuola funcional.
- Sortin2 no afecta la morfología ni la funcionalidad del citoesqueleto.
- Sortin2 altera componentes específicos de la ruta endocítica. Altera endosomas tardíos/PVC y vacuola, pero no altera endosomas tempranos/TGN.
- El blanco celular de Sortin2 está entre las vías de tráfico entre los endosomas tempranos(TGN) y los endosomas tardíos(PVC), según dos tipos de evidencia; localización de marcadores y co-tratamientos con las drogas.
- El efecto de Sortin2 es diferente al otras drogas que afectan el sistema de endomembranas y depolimerizadores de citoesqueleto, por lo que se perfila como una droga distinta de las clásicamente usadas en biología celular.
- Sortin2 impide la degradación diferencial de PIN2 concordantemente con inhibir la respuesta gravitrópica en plantas desarrolladas.
- Sortin2 estimula la aparición de raíces laterales e inhibe el crecimiento de la raíz principal en plántulas de 7 días.
- Sortin2 afecta la señalización de auxinas río arriba a la formación del complejo SCF-TIR y de la degradación de los represores de la familia Aux/IAA

BIBLIOGRAFIA

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wiśniewska J y Col. 2006. Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* 8: 249-56
- Bolte S, Talbot C, Boute Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B. 2004. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of microscopy* 214: 159-73
- Bonifacino JS, Glick BS. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-66
- Carter CJ, Bednarek SY, Raikhel NV. 2004. Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches. *Curr Opin Plant Biol* 7: 701-7
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR. 2000. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3718-23
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof Y-D, Schumacher K. 2006. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 715-30
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J y Col. 2007. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* 17: 520-7
- Dhonukshe P, Grigoriev I, Fischer R, Tominaga M, Robinson DG y Col. 2008a. Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4489-94
- Dhonukshe P, Tanaka H, Goh T, Ebine K, Mähönen AP y Col. 2008b. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456: 962-6
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G, Palme K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-8
- Geldner N, Hyman DL, Wang X, Schumacher K, Chory J. 2007. Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* 21: 1598-602
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. 2001. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-6
- Hayashi K-i, Jones AM, Ogino K, Yamazoe A, Oono Y y Col. 2003. Yokonolide B, a novel inhibitor of auxin action, blocks degradation of AUX/IAA factors. *J Biol Chem* 278: 23797-806
- Hayashi K-i, Kamio S, Oono Y, Townsend LB, Nozaki H. 2009. Toyocamycin specifically inhibits auxin signaling mediated by SCFTIR1 pathway. *Phytochemistry*: 1-8
- Henderson J, Baully JM, Ashford DA, Oliver SC, Hawes CR y Col. 1997. Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. *Planta* 202: 313-23
- Hicks GR, Raikhel NV. 2009. Opportunities and challenges in plant chemical biology. *Nat Chem Biol* 5: 268-72
- Jelínková A, Malínská K, Simon S, Kleine-Vehn J, Parezová M y Col. 2010. Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking? *Plant J* 61: 883-92
- Kaschani F, van der Hoorn R. 2007. Small molecule approaches in plants. *Curr Opin Chem Biol* 11: 88-98

- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M, Friml J. 2006. Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* 18: 3171-81
- Kleine-Vehn J, Leitner J, Zwiewka M, Sauer M, Abas L y Col. 2008. Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17812-7
- Laxmi A, Pan J, Morsy M, Chen R. 2008. Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* 3: e1510
- Leonelli S. 2007. Arabidopsis, the botanical Drosophila: from mouse cress to model organism. *Endeavour* 31: 34-8
- Macgregor DR, Deak KI, Ingram PA, Malamy JE. 2008. Root system architecture in Arabidopsis grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *Plant Cell* 20: 2643-60
- Mockaitis K, Estelle M. 2008. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 55-80
- Morejohn LC, Fosket DE. 1991. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. *Pharmacol Ther* 51: 217-30
- Morton W, Ayscough K, McLaughlin P. 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol*
- Nebenfuhr A. 2002. Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion. *Plant Physiol* 130: 1102-1108
- Paciorek T, Friml J. 2006. Auxin signaling. *J Cell Sci* 119: 1199-202
- Paciorek T, Paciorek T, Za[[Zcaron]][[[acute]]Malov[[[Aacute]] E, Za[[Zcaron]][[[acute]]Malov[[[Aacute]] E, Ruthardt N y Col. 2005. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435: 1251
- Pérez P. 2009. Analisis del Efecto de Sortin2 en la Respuesta a Auxinas y en el Sistema de Endomembranas. *Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile*
- Raikhel N, Pirrung M. 2005. Adding precision tools to the plant biologists' toolbox with chemical genomics. *Plant Physiol* 138: 563-4
- Richter S, Voß U, Jürgens G. 2009. Post-Golgi Traffic in Plants. *Traffic* 10: 819-828
- Robert S, Chary SN, Drakakaki G, Li S, Yang Z y Col. 2008. Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8464-9
- Robinson DG, Jiang L, Schumacher K. 2008. The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Physiol* 147: 1482-92
- Sakamoto K, Briggs WR. 2002. Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14: 1723-35
- Samaj J, Baluska F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D, Menzel D. 2004. Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 135: 1150-61
- Surpin M, Raikhel N. 2004. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 100-9
- Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B y Col. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* 10: 946-54
- Taiz L, Zeiger E. 2010. Plant Physiology. *Sinauer Associates*. 5ta Edición.
- Tian G-W, Mohanty A, Chary SN, Li S, Paap B y Col. 2004. High-throughput fluorescent tagging of full-length Arabidopsis gene products in planta. *Plant Physiol* 135: 25-38
- Vanneste S, Friml J. 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005-16

- Viotti C, Bubeck J, Stierhof Y-D, Krebs M, Langhans M y Col. 2010. Endocytic and Secretory Traffic in Arabidopsis Merge in the Trans-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic Organelle. *THE PLANT CELL ONLINE* 22: 1344-1357
- Zhao Y, Dai X, Blackwell HE, Schreiber SL, Chory J. 2003. SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science* 301: 1107-10
- Zouhar J, Hicks GR, Raikhel NV. 2004. Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9497-501