

UCH-FC
Biotecnología
S. 235
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

BÚSQUEDA DE GENES VEGETALES
ORTÓLOGOS DEL COMPLEJO EXOCYST
DE *Saccharomyces cerevisiae*

MARGARITA PAZ SANTIAGO CALDERÓN

DIRECTOR DE TESIS: Dr. HERMAN SILVA
Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello



Enero 2007



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

“BÚSQUEDA DE GENES VEGETALES ORTÓLOGOS DEL COMPLEJO EXOCYST DE *Saccharomyces cerevisiae*”

MARGARITA PAZ SANTIAGO CALDERÓN

**Dr. Herman Silva Ascencio
Director Seminario de Título**

Handwritten signature of Herman Silva Ascencio in black ink, positioned above a horizontal line.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

**Dr. Víctor Cifuentes Gúzman
Presidente Comisión**

Handwritten signature of Víctor Cifuentes Gúzman in blue ink, positioned above a horizontal line.

**Dra. Claudia Stange
Correctora**

Handwritten signature of Claudia Stange in blue ink, positioned above a horizontal line.

Santiago de Chile, 8 de Enero 2007



Nací el lluvioso sábado 2 de agosto de 1980. Crecí y fui criada junto a mi papá Emilio y mi mamá Margarita. Tres años y medio más tarde llegó mi hermana Fernanda. Cuando tuve la edad suficiente entré al mismo colegio donde estaban mis primos. Ahí conocí a mis mejores amigas. El tiempo pasó rápido, entre juegos, cumpleaños y vacaciones eternas en el Quisco. De pronto estaba dando la P.A.A y tomando la primera decisión grande de mi vida. Entre a Bachillerato en la U, para luego cambiarme a Biotecnología. Hoy, estando tan cerca de mi titulación, quiero decir que durante todos estos años en la Facultad de Ciencias conocí a personas que jamás olvidaré, crecí y aprendí mucho (en todos los sentidos que pueden abarcar estas palabras).

A mi papá, mamá y hermana

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer el constante apoyo de mi tutor, quien me guió y a la vez me dió libertad para realizar este trabajo. También a mi co tutora, la Dra. Liliana Cardemil, por su preocupación y ayuda.

A los miembros del grupo HS por sus consejos y buenos momentos: Loreto Prat, Fernando Olate, Simón Segovia, Andrés Tittarelli, a los que ya no están Manuel Bugueño y Francisco Duarte, y a los que pasaron por un tiempo Felipe Vargas y Janet Torres.

A todos los integrantes del Centro de Biotecnología Vegetal: Mariela González, Susana González, Jonathan Maldonado, Mariano Latorre, Juan Saba, Carolina Cortés, Gabriel León, Enzo Pantoja, Viviana Pardo, Raúl Castillo, Consuelo Ibar, Rafael Torres, Cecilia Rodríguez, Maribel Donoso, Alexander Vergara, Paula Vizoso, Dra. Lee Meisel, Dr. Ariel Orellana y en especial a Francisca Reyes, Ricardo Tejos, Rodrigo Caroca, Andrea Morales, Daniela Urbina y Ricardo Nilo. También a los ex miembros del lab: Daniela Gómez, Carlos Saffie y Roberto Bastías.

Y a los ex integrantes del laboratorio de Genética Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias: Michael Handford, Sebastián Urbina y Angélica Vega.

Esta tesis fue financiada por Millennium Nucleus in Plant Cell Biology P02-009-F.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA	i
BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	6
3.1. OBJETIVO GENERAL	6
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	7
4.1.1.- Bacterias y condiciones de cultivo	7
4.1.2.- Levaduras y condiciones de cultivo	7
4.1.3.- Plantas y condiciones de cultivo	8
4.2. DNA	9
4.2.1.- Plasmidios	9

4.2.2.- Genoteca	9
4.2.3.- Clones	10
4.2.4.- Partidores	10
4.3. Anticuerpos	11
4.4. Bases de datos y programas de análisis	11
4.4.1.- Obtención y análisis de secuencias	11
4.4.2.- Análisis en base de datos de co-respuesta de <i>A. thaliana</i>	12
4.4.3.- Análisis <i>in silico</i> de expresión de genes de Arabidopsis utilizando Genevestigator	12
4.4.4.- Análisis de la estructura de la proteína codificada por el gen At2g23120	13
4.5. Clonamiento de genes en el vector pGPD-myc	13
4.6. Conversión de la genoteca λ YES en una genoteca plasmidial (pYES)	14
4.7. Técnicas utilizadas en levaduras	15
4.7.1.- Preparación de células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	15
4.7.2.- Transformación de células competentes por estrés térmico	15
4.7.3.- Extracción de DNA plasmidial de levadura	16
4.7.4.-Extracción de DNA genómico de levadura	16
4.7.5.- Extracción de proteínas de levadura para western blot	17
4.8. Técnicas utilizadas en Arabidopsis	18
4.8.1.- Extracción de RNA	18
4.8.2.- Inmunolocalización	18
4.9. Técnicas generales de biología molecular	19

4.9.1.- Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	19
4.9.2.- Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	20
4.9.3.- Minipreparación de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	21
4.9.4.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	21
4.9.5.- Digestión de DNA con endonucleasas de restricción	22
4.9.6.- Ligación de DNA utilizando T4 DNA ligasa	22
4.9.7.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
4.9.8.- Secuenciación	23
4.9.9.- Western blot	23
4.9.10.- RT-PCR	24
4.9.11.- Cuantificación de proteínas por BCA	25
4.9.12.- Cuantificación de RNA	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Identificación de secuencias proteicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ortólogas a las ocho subunidades del complejo exocyst de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
5.2. Clonamiento de cuatro cDNAs de <i>Arabidopsis thaliana</i> , ortólogos a subunidades del complejo exocyst de levadura, en el vector pGPD-myc	28
5.3. Complementación de levaduras mutantes secretorios termosensibles con los vectores de expresión pGPDA _{AtSec} -myc	29
5.4. Complementación de levaduras mutantes secretorios termosensibles con una genoteca de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
5.5. Clonación en pGEM y secuenciación del fragmento recuperado desde el mutante en Sec5 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36

5.6. Análisis del patrón de expresión del gen At2g23120	38
5.7. Análisis del producto proteico del gen At2g23120	44
5.8. Inmunolocalización en plantas de Arabidopsis utilizando un anticuerpo para la subunidad Exo70 del complejo exocyst humano	47
6. DISCUSIÓN	49
7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	59
8. BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas en los experimentos de complementación.	8
Tabla 2:	Partidores utilizados durante el desarrollo de esta tesis.	10
Tabla 3:	Identidad entre los ortólogos de las subunidades del complejo exocyst en <i>Arabidopsis</i> comparado con levaduras.	27
Tabla 4:	Vectores para la complementación de mutantes secretorios de levadura.	28
Tabla 5:	Genes que coexpresan de forma positiva (aumentan su expresión) junto a At2g23120 durante el desarrollo de <i>Arabidopsis</i> .	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Modelo del complejo exocyst en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	2
Figura 2:	Verificación de la clonación de los cDNAs ortólogos de las subunidades Sec5, 6, 8 y 10 de Arabidopsis en el vector pGPD-myc.	29
Figura 3:	Complementación de mutantes Sec.	31
Figura 4:	Expresión de las proteínas codificadas por los cDNAs de Arabidopsis en los mutantes de levadura.	32
Figura 5:	Complementación del fenotipo mutante de la cepa NY402 (sec5-24).	33
Figura 6:	Curva de crecimiento de levaduras.	34
Figura 7:	Complementación de la actividad secretoria de la cepa NY402 (sec5-24).	35
Figura 8:	Identificación del cDNA contenido en el vector pYES5c.	36
Figura 9:	Alineamiento mediante ClustalW de la secuencia aminoacídica codificada por el gen At2g23120 y las proteínas con las que presenta mayor homología: PvLEA-18 de <i>Phaseolus vulgaris</i> y PM21 de <i>Glycine max</i> .	37
Figura 10:	Patrón de expresión del gen At2g23120 en distintos órganos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	40
Figura 11:	Patrón de expresión del gen At2g23120 en distintas etapas del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	41
Figura 12:	Resultado del análisis de la estructura proteica codificada por el gen At2g23120 mediante PROF.	45
Figura 13:	Resultado del análisis de la estructura proteica codificada por el gen At2g23120 mediante RONN.	46
Figura 14:	Inmunolocalización utilizando un anticuerpo anti-Exo70 humano en plántulas de Arabidopsis.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AGI	Arabidopsis Genome Initiative (Iniciativa Genoma de Arabidopsis)
BCA	Bicinchoninic acid (ácido bicinconínico)
BFA	Brefeldina A
BSA	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
BLAST	Basic local alignment search tool (herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales)
cDNA	DNA complementario
GEF	Guanine exchange factor (factor intercambiador de nucleótido guanosina)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
D.O ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
DTT	Ditiotreitol
dNTPs	Deoxiribonucleotidos trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamminotetra acético
GTP	Guanosin trifosfato
IPTG	Isopropil-tiogalactopiranosido
Kb	Kilo base
LEA	Late embryogenesis abundant (abundante en embriogénesis tardía)
LiAc	Acetato de litio
m.o.i	Multiplicity of infection (Multiplicidad de infección)



NaAc	Acetato de sodio
ORF	Open reading frame (marco de lectura abierto)
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Reverse transcription (Transcripción reversa)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SGD	Saccharomyces Genome Database (Base de datos de Saccharomyces)
TAIR	The Arabidopsis Information Resource (Fuente de información de Arabidopsis)
TEMED	N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
UTR	Untranslated region (región no traducida)
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

RESUMEN

Las plantas son organismos altamente polarizados. Esta característica se manifiesta a primera vista en su morfología, distinguiéndose dos zonas con funciones muy distintas, la zona aérea y la zona de las raíces. Dado que las células vegetales no migran, el direccionamiento de la elongación y división celular son procesos importantes en la determinación de tejidos y órganos en la planta. Consecuentemente, el sistema secretorio se vuelve esencial en la biogénesis de la identidad celular que va a ser reflejo en la morfogénesis de la planta. Durante la germinación del tubo polínico, la elongación de los pelos radiculares y el transporte de auxina, el sistema secretorio se polariza hacia dominios específicos de la membrana plasmática. En plantas los factores celulares que participan en esta polarización de la exocitosis son desconocidos. Sin embargo, en muchos eucariontes la secreción polarizada requiere de la participación de un complejo denominado exocyst, el cual tendría la función de posicionar a la vesícula secretoria en el dominio de la membrana plasmática donde posteriormente se fusionará. El complejo está formado por ocho subunidades (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84) y fue identificado a través de mutantes secretorios termosensibles de *Saccharomyces cerevisiae*.

En *Arabidopsis thaliana* se han predicho ortólogos para las subunidades del complejo exocyst, pero hasta el momento no existe ningún estudio que demuestre su funcionalidad.

En esta tesis se buscaron genes que complementaran mutantes secretorios termosensibles de levadura. Se utilizaron cuatro cDNAs ortólogos a las subunidades Sec5, Sec6, Sec8 y Sec10, además de una genoteca de cDNA de *Arabidopsis*. Encontramos un cDNA capaz de complementar el defecto secretorio del mutante en Sec5. Este gen se expresa en *Arabidopsis* y codifica una proteína tipo LEA.

ABSTRACT

Plants are highly polarized organisms. This characteristic is evident at first sight in the morphology where an aerial part and roots are distinguished, both with different functions. Due to the inability of plant cells to migrate, the direction of cellular elongation and division are important processes in the fate of the different plants tissues and organs. Consequently, the secretory pathway becomes an essential component in the biogenesis of the cellular identity that will be reflected in plant morphogenesis.

During germination of the pollen tube, root hair elongation and auxin transport, the secretory pathway is polarized to specific domains of the plasma membrane. The cellular factors that play a role in the polarized exocytosis in plants are unknown. However, in many eucaryotes, polar exocytosis requires the involvement of the exocyst complex, that targets secretory vesicles to specific sites of the plasma membrane where they will fuse. The complex is formed by eight subunits (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84) and was identified through temperature-sensitive secretory mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.

Orthologs for all the subunits of the exocyst complex have been identified in Arabidopsis, but there are not functional studies of them.

In this thesis four cDNA orthologs of the Sec5, Sec6, Sec8 and Sec10 exocyst components, and an Arabidopsis cDNA library were used to complement yeast secretory mutants. As a result, it was found a cDNA capable to complement the secretory defect of the Sec5 mutant. This gene is expressed in Arabidopsis and encodes a LEA-like protein.

1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos altamente polarizados. Esto se evidencia en el establecimiento de un eje apical-basal durante la primera división cigótica, el cual es mantenido hasta que la planta alcanza su estado adulto. En términos evolutivos, el desarrollo del eje apical-basal posee una fuerte ventaja selectiva basada en la competitividad de la planta por captar luz, agua y nutrientes, elementos indispensables para el éxito reproductivo del organismo (Souter & Lindsey, 2000).

La polaridad celular en las plantas se manifiesta en muchos procesos, como por ejemplo durante la citoquinesis, el transporte de moléculas, la destinación de proteínas a distintos dominios de la membrana o en la expansión de la superficie celular.

El establecimiento de esta polaridad celular requiere de una señal (intrínseca o extrínseca), seguida de una cascada de eventos moleculares que finalizan en una reorganización del citoesqueleto y del sistema secretorio, para formar un nuevo dominio en la membrana plasmática (Drubin & Nelson, 1996).

En muchos organismos, la exocitosis polarizada requiere de la participación de un complejo proteico conocido como exocyst. Este complejo está formado por ocho subunidades, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84 (Figura 1), la mayoría identificadas inicialmente como mutantes secretorios termosensibles en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Novick y col., 1980). En *S. cerevisiae*, la mutación de cualquiera de las subunidades del complejo exocyst detiene el crecimiento polarizado de la yema, provocando una acumulación de vesículas secretorias en las cercanías de la membrana blanco. En mamíferos se han identificado genes ortólogos

para todas las subunidades del complejo (Hsu y col., 1996). El rol fundamental del complejo exocyst, tanto en levaduras como en mamíferos, es posicionar a una vesícula que viaja polarmente desde el trans Golgi en las cercanías del dominio de la membrana plasmática donde posteriormente se fusionará mediante la acción de las SNAREs. La localización subcelular del complejo siempre se correlaciona con sitios de exocitosis polarizada.

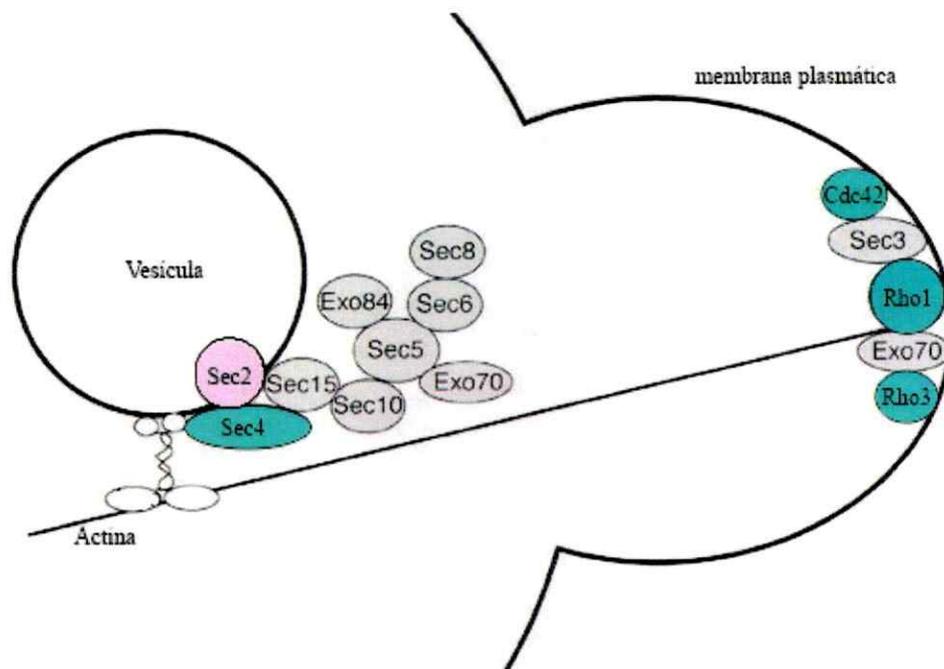


Figura 1: Modelo del complejo exocyst en *Saccharomyces cerevisiae*. En gris se destacan las ocho subunidades del complejo, en celeste las GTPasas asociadas a este y en rosado el GEF de la GTPasa Sec4.

A pesar de la importancia de este complejo en la exocitosis, se conoce muy poco acerca de su regulación. Actualmente, se sabe que todas las subunidades del complejo exocyst de levaduras y mamíferos son grandes (70-150 kDa) e hidrofílicas. Seis de las ocho subunidades (Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15 y Exo84) se asocian directamente a las vesículas secretorias mientras viajan a los sitios de exocitosis a través de cables de actina

(Boyd y col., 2004), por lo que su localización es dependiente tanto del citoesqueleto de actina como del sistema secretorio. Muy por el contrario, la localización de la subunidad Sec3 es directamente en la membrana plasmática, en el sitio de exocitosis polarizada (Finger & Novick, 1998) y es independiente del citoesqueleto de actina y del sistema secretorio. La subunidad Exo70 utiliza dos mecanismos para su localización, la mitad de la población llega al sitio de exocitosis en las vesículas secretorias, como la mayoría de las subunidades del complejo, en cambio la otra mitad es destinada por una vía independiente de actina con una cinética idéntica a la de la subunidad Sec3 (Boyd y col., 2004). Por estas razones, se ha postulado a Sec3 y Exo70 como los marcadores en la membrana de los sitios exocíticos (Figura 1).

La función del complejo exocyst está regulada por varias GTPasas. En *S. cerevisiae* la Rab GTPasa Sec4 en su forma GTP, se une a la vesícula secretoria e interactúa con la subunidad Sec15 del complejo la cual posteriormente reclutaría al resto de las subunidades. También en levaduras, la localización de Sec3 requiere de la GTPasa Rho1 (Guo y col., 2001) y de la GTPasa Cdc42 (Zhang y col., 2001), cuyas formas activas (unidas a GTP) interactúan directamente con el dominio amino terminal de Sec3. La interacción de otra GTPasa de la familia Rho, Rho3, con el dominio carboxilo terminal de la subunidad Exo70 es necesaria para la función secretoria (Adamo y col., 1999).

En mamíferos, al igual que en levaduras, la subunidad Sec15 interactúa con una Rab GTPasa, Rab11 (Zhang y col., 2004). Sin embargo la interacción Sec3-Rho1 no se encuentra conservada, pero si lo está la interacción entre Exo70-Rho3. En este caso Exo70 se une con el miembro de las Rho GTPasas de mamíferos conocido como TC10, pero a diferencia de lo observado en levaduras, la interacción ocurre a través del extremo

amino terminal de la subunidad (Dong y col., 2005). En mamíferos existe una interacción entre la subunidad Sec5 (a través de un dominio que abarca los primeros 80 aminoácidos) y la GTPasa RalA, que pertenece a una familia de GTPasas que no se encuentra en levaduras (Mott y col., 2003).

En plantas, con la excepción de algunas Rabs como Rab1 (Batoko y col., 2000) y Rab2 (Cheung y col., 2002), cuya función esta involucrada en el tráfico entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, se conoce muy poco acerca de las funciones de otras proteínas Rabs y de su posible rol en el tráfico vesicular polarizado. Debido a la alta conservación de las funciones de estas proteínas, el rol del resto de las Rabs vegetales se ha inferido en base a homología de secuencias y estudios de localización, clasificándolas en 12 subfamilias. Últimamente se encontró una relación de las proteínas Rabs en la formación de la placa celular, gracias a la identificación del gen SCD1 (stomatal cytokinesis defective) que codifica para una proteína homóloga a un GEF para proteínas Rabs, el cual es requerido para la citoquinesis de estomas en desarrollo y en la expansión de varios tipos celulares (Bednarek & Falbel, 2002).

Al igual que con las proteínas Rabs, existe muy poca información acerca de la existencia y función de los factores involucrados en la destinación de vesículas secretorias que viajan de manera polar a la membrana plasmática. Se ha descrito que el genoma de *Arabidopsis* codifica para genes ortólogos de las ocho subunidades del complejo exocyst (Jurgens & Geldner, 2002), pero hasta el momento no existe ningún análisis funcional de estos ortólogos en plantas.

Estudios mediante microscopía electrónica, evidencian de manera muy indirecta la existencia del complejo al analizar la formación de la placa celular (proceso que

involucra una forma especial de exocitosis polarizada) durante la citoquinesis de células somáticas de *Arabidopsis thaliana* (Seguí-Simarro y col., 2004). Esto sugeriría que las vesículas que participan en la formación de la placa celular son ensambladas a la matriz de la placa antes de la fusión y que esta acción es llevada a cabo por complejos similares, tanto en geometría como en tamaño, a los complejos exocyst aislados desde cerebro de rata por Hsu y col., 1998. Estas mismas estructuras tipo exocyst se visualizaron al observar al microscopio electrónico la formación de la placa celular en citoquinesis post-meiótica durante el desarrollo del polen en *Arabidopsis* (Otegui & Staehelin, 2004).

Las últimas evidencias experimentales publicadas con respecto a la existencia y funcionalidad de un complejo tipo exocyst en plantas, revelan que un mutante insercional de *Arabidopsis* en el gen que codifica para un ortólogo de la subunidad Sec8 es incapaz de germinar el tubo polínico (Cole y col., 2005), defecto que es transmitido a través del gametofito masculino (polen). Además del hallazgo del mutante *rth1* en maíz, el cual presenta una mutación en el gen ortólogo de Sec3, cuyo fenotipo es una planta sin pelos radicales (Wen y col., 2005). Estos dos reportes aportan una evidencia funcional indirecta, que podría relacionar estos genes vegetales ortólogos de dos subunidades del complejo exocyst como parte de una maquinaria de secreción polarizada.

Con el objetivo de identificar genes ortólogos vegetales que pudiesen estar relacionados con exocitosis polarizada, en el presente trabajo de tesis se analizó la capacidad de cuatro cDNAs de *Arabidopsis*, ortólogos a las subunidades Sec5, Sec6, Sec8 y Sec10 del complejo exocyst, de complementar mutantes secretorios termosensibles de *S. cerevisiae*

en dichas subunidades. Como una forma de ampliar este análisis también se utilizó una genoteca de *Arabidopsis* para la complementación de los mismos mutantes de levadura mencionados anteriormente, además del mutante en Sec3 y Sec15.

Según los antecedentes mencionados anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis:

2.- HIPÓTESIS

La exocitosis polarizada en *Arabidopsis thaliana*, al igual que en el resto de las células eucariontes, es dirigida por un complejo tipo exocyst.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Caracterizar una posible función secretoria de putativos genes vegetales ortólogos del complejo Exocyst.

3.2.- Objetivos específicos

1. Buscar ortólogos vegetales de las proteínas que componen el complejo exocyst, complementando mutantes de levaduras.
2. Analizar la secuencia y expresión del o los putativo(s) gen(es) ortólogo(s) de *Arabidopsis*.
3. Utilizar anticuerpos heterólogos para identificar el putativo complejo exocyst vegetal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Material Biológico

4.1.1.- Bacterias y condiciones de cultivo

La cepa en la cual se transformaron todos los constructos fue *Escherichia coli* DH5a, la cual se creció en medio LB (Luria Bertani: peptona 1% (p/v); extracto de levadura 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v)) a 37 ° C por 12 horas con agitación. El antibiótico de selección fue ampicilina (100µg/µl).

La cepa BNN132 (JM107/λKC), utilizada para la conversión de la genoteca λYES (ver descripción en 4.2.2.) en una genoteca plasmidial, fue donada por el Dr. Athanasios Theologis (Plant Gene Expression Center, Berkeley, USA).

4.1.2.- Levaduras y condiciones de cultivo

Todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas en esta tesis fueron donadas por el Dr. Peter Novick (School of Medicine, Yale University, USA).

Las ocho cepas correspondientes a mutantes secretorios derivan de la cepa NY13. Los fenotipos relevantes de las cepas se pueden ver en la Tabla 1.

Debido a una mutación en la síntesis de uracilo (ura3-52) todas las cepas fueron crecidas en medio completo YPD líquido (extracto de levadura 1% (p/v); peptona 2% (p/v); dextrosa 2% (p/v)) o sólido (YPD líquido más agar 1,5% (p/v)). Una vez transformadas las cepas con alguno de los constructos, los transformantes fueron seleccionados en medio mínimo líquido (base nitrogenada levadura 0,17% (p/v); (NH₄)₂SO₄ 0,5% (p/v); glucosa 2% (p/v); leucina 0,006% (p/v); lisina 0,003% (p/v); histidina 0,002% (p/v) y

triptofano 0,004% (p/v) o sólido (medio mínimo más agar 1,6% (p/v)). Los cultivos líquidos se incubaron en un agitador a 250 rpm durante 16 horas a 30°C. Para los experimentos de complementación la temperatura restrictiva fue de 37° C. En el ensayo de secreción de invertasa las levaduras se incubaron durante 16 horas en placas BCP/sacarosa (verde de bromocresol 0,003% (p/v); base nitrogenada levadura 0,67% (p/v); galactosa 5 % (p/v); sacarosa 2% (p/v); leucina 0,006% (p/v); lisina 0,003% (p/v); histidina 0,002% (p/v) y triptofano 0,004% (p/v)).

Tabla 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en los experimentos de complementación.

Nombre	Genotipo
NY13	MAT a ura 3-52
NY412	MAT a sec3-2 ura3-52
NY402	MAT a sec5-24 ura3-52
NY17	MAT a sec6-4 ura3-52
NY410	MAT a sec8-9 ura3-52
NY61	MAT a sec10-2 ura3-52
NY64	MAT a sec15-1 ura3-52
NY130	MAT a sec2-41 ura3-52
NY405	MAT a sec4-8 ura3-52

4.1.3.- Plantas y condiciones de cultivos

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Las plantas fueron crecidas en una cámara con foto período de 16 horas ($140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 22° C por tres meses. Las semillas recolectadas fueron esterilizadas con etanol 70% (v/v) por 5 minutos, cloro comercial 50% (v/v) por 5 minutos y 3 lavados con agua destilada estéril, y almacenadas a 4° C en oscuridad durante 48 horas. Posteriormente fueron sembradas en placas con

medio MS (Murashige & Skoog, 1962), Phytotechnology, pH 5,8 más agar 0,8% (p/v) y sacarosa 0,1% (p/v).

4.2 DNA

4.2.1.- Plasmidios

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron los vectores pGEM-T Easy (Promega), para clonar productos de PCR y el vector pGPD-myc, el cual permite clonar un gen en marco de lectura con el epítopo myc y expresar esta proteína de fusión en levaduras.

4.2.2.- Genoteca

La genoteca λYES fue donada por el Dr. Ronald Davis (Stanford University, School of Medicine, USA). Consiste en un vector multifuncional que tiene la capacidad de replicarse como fago lambda, como plasmidio lisógeno en *E. coli* o como plasmidio centromérico en levaduras. La parte plasmidial del vector puede ser escindida desde el fago lambda por recombinación sitio específica usando la proteína cre y los sitios lox del vector. Los cDNAs no están insertados direccionalmente, por lo que en una dirección pueden ser expresados desde el promotor lac de *E. coli* y en la otra dirección pueden ser expresados desde el promotor gal1 de levadura. Los cDNAs se encuentran insertos en un sitio XhoI, flanqueado por sitios EcoRI. Los cDNAs provienen de RNA mensajero de tejido aéreo de plantas de *Arabidopsis* de diferentes estadios del desarrollo, desde plántulas a plantas en floración. La titulación de la genoteca es de $6,2 \times 10^9$ fagos por ml.

4.2.3.- Clones

Los clones pda11569, pda04132, pda07158 y U09918 contienen las secuencias completas de los cDNAs de los siguientes genes de Arabidopsis: At1g76850 (AtSec5), At3g10380 (AtSec8), At5g12370 (AtSec10) y At1g71820 (AtSec6) respectivamente. Estos cDNAs codifican para ortólogos de las subunidades del complejo exocyst, mencionada entre paréntesis. Los tres primeros clones fueron obtenidos desde RIKEN (www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/) y el último desde TAIR (www.arabidopsis.org).

4.2.4.- Partidores

Tabla 2: Partidores utilizados durante el desarrollo de esta tesis.

Nombre partidor	Secuencia 5'→3'	Tm* (°C)	% GC
AtS5-F	GCTAGCATGTCGAGCGATAGCAATGATCT NheI	66	44
AtS5-R	GCGGCCGCCCTCTTCGTCTGGGTCGGGCATTAA NotI	78	56
AtS6-F	ACTAGTATGATGGTCGAAGATCTTGGTGTGG SpeI	74	48
AtS6-R	GCGGCCGCCCAGTGAGTTTTCGCCACATAGATCC NotI	78	50
AtS8-F	GGATCCATGGGGATTTTCAATGGTTTGCCTG BamHI	72	44
AtS8-R	GCGGCCGCCCATGAGAAAGAATTTCCAAAAGGC GGG NotI	82	44
AtS10-F	GGATCCATGACAGAACGAATCAGAGCAAGAGG BamHI	76	46
AtS10-R	GCGGCCGCCCGCTCAAGCTTGGCCACAAGGAGC NotI	82	64
AtC-F	CGATGCGAAAGCTCCGTGAAAA	66	50
AtC-R	CATTATCAAAAAGAAATAAGCTTCAC	66	27
AtAc-F	CACACTTTCTACAATGAGCT	56	40
AtAc-R	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT	58	45
ScS5-F	GGATCCATGGATAGGTTTCAAATTGGCG BamHI	62	41
ScS5-R	GCGGCCGCCCGCTGAAGGCGGCGAATTGAA NotI	70	54

* Tm: temperatura de fusión, a la cual la mitad de las moléculas complementarias se encuentran unidas. En negrita se destacan los sitios de corte para enzimas de restricción adicionados para los clonamientos. En el cálculo de la Tm y del contenido de GC no se consideraron los sitios de restricción.

Todos los partidores fueron diseñados manualmente desde las secuencias publicadas en los sitios de TAIR y SGD (www.yeastgenome.org), para el caso de *Arabidopsis* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente. Los oligos fueron sintetizados en AlphaDNA, Canada (www.alphadna.com).

4.3 Anticuerpos

Para la detección de las proteínas fusionadas a myc mediante western blot, se utilizó el anticuerpo producido en ratón anti- myc (Santa Cruz Biotechnology, USA, www.scbt.com) diluido 1:400 en BSA 2% (p/v) en T-PBS. El anticuerpo secundario fue un anti ratón IgG- HRP hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido 1:10.000.

Además se usó un anticuerpo producido en conejo anti-Exo70 humano donado por la Dra. Martha Vaughan (National Institute of Health, USA). Para la inmunolocalización la dilución usada fue de 1:100. El anticuerpo secundario utilizado a una dilución de 1:500 fue producido en ratón anti-IgG Alexa Fluor 488.

4.4 Bases de datos y programas de análisis

4.4.1.- Obtención y análisis de secuencias

Las secuencias proteicas de las subunidades del complejo exocyst de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvieron desde el sitio SGD. Las secuencias de *Arabidopsis* ortólogas para estas proteínas se buscaron mediante la herramienta BLAST (Altschul y col., 1990) usando la base de datos de proteínas AGI (www.arabidopsis.org). Los alineamientos

globales entre las secuencias de levaduras y Arabidopsis se realizaron a través del programa Stretcher (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/stretcher.html>).

La comparación de la identidad de secuencias se realizó utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

4.4.2.- Análisis en base de datos de co-respuesta de *A. thaliana*

Los datos de co-respuesta para el gen At2g23120 se realizaron a través de la base de datos CSB.DB de Arabidopsis (Steinhauser y col., 2004) del Max Plank Institute (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/dbcor/ath.html>). El análisis (Single Gene Query) se hizo utilizando la matriz de desarrollo que contiene el análisis de expresión de 12.200 genes provenientes de 63 experimentos y escogiendo el coeficiente de Spearman positivo (Bonnet & Wright, 2000) para la correlación.

4.4.3.- Análisis *in silico* de expresión de genes de Arabidopsis utilizando Genevestigator

Los valores de expresión *in silico* de los genes At2g23120, At2g23110 y Actina 7 de Arabidopsis fueron obtenidos desde la base de datos Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch/at), que es una interface de los resultados de experimentos de microarreglos basados en el chip de Affimetrix (Zimmermann y col., 2004). Las herramientas utilizadas para el análisis fueron: Gene Atlas, que otorga promedios de valores de intensidad de señales de un gen de interés en todos los órganos o tejidos anotados en la base de dato, Gene Chronologer, que da como resultado promedios de valores de intensidad de señales de un gen de interés en diez etapas representativas del

ciclo de vida de *Arabidopsis* (Boyes y col., 2001). Y por último se utilizó la herramienta Response Viewer, que provee el mismo tipo de resultado de Gene Atlas o de Gene Chronologer, pero basado en anotaciones de respuesta a estrés.

4.4.4.- Análisis de la estructura de la proteína codificada por el gen At2g23120

El producto proteico del gen At2g23120 fue analizado a través del servidor PredictProtein (www.predictprotein.org), el cual retorna como resultado alineamientos, motivos, regiones de baja complejidad, regiones sin estructuras regulares y predicción de estructura secundaria, accesibilidad al solvente, regiones globulares, hélices transmembranas, regiones coil-coil y puentes disulfuro, entre otros (Rost y col., 2004). La secuencia aminoacídica se ingresa al servidor y los resultados son enviados al correo electrónico del usuario.

Como una manera de corroborar la falta de estructuras secundarias predicha por PredictProtein, se utilizó el programa RONN (www.stubi.ox.ac.uk/RONN) el cual predice desorden en secuencias proteicas (Yang y col., 2005). La localización subcelular fue predicha usando PSort (<http://psort.nibb.ac.jp>) y LOctree (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi-bin/var/nair/loctree/query>).

4.5- Clonamiento de genes en el vector pGPD-myc

Se usaron los partidores AtS5-F y R; AtS6-F y R; AtS8-F y R; AtS10-F y R para amplificar los cDNAs de los genes At1g76850, At3g10380, At5g12370 y At1g71820 de *Arabidopsis* usando como templado clones individuales (descritos en 4.2.3). Cada fragmento fue purificado usando el kit EZNA, Omega Bio-Tek, para luego ser clonados

en el vector pGEM-T Easy. El fragmento fue escindido cortando con las enzimas cuyos sitios de restricción fueron agregados en los partidores y se subclonaron en el vector pGPD-myc cortado con las mismas enzimas.

La misma estrategia se utilizó para clonar en este vector el gen que codifica para la proteína Sec5 de *Saccharomyces cerevisiae*, amplificando desde DNA genómico con los partidores ScS5-F y R.

Todos los partidores fueron diseñados para eliminar el codón de término y agregar sitios de restricción (Tabla 1) para facilitar la clonación.

4.6 Conversión de la genoteca λ YES en una genoteca plasmidial (pYES)

Fagos a una m.o.i de 0,01 fueron incubados con 1 ml de cultivo de noche fresco (suplementado con 50 μ g/ μ l de kanamicina y maltosa 0,2% (p/v)) de células BNN132 en $MgCl_2$ 10 mM por treinta minutos a 30° C sin agitación. Dos ml de medio LB fueron agregados y las células se incubaron por una hora a 30° C con agitación. 200 μ l de células fueron plaqueadas en un total de 10 placas LB con ampicilina (50 μ g/ml) y glucosa 0,1% (p/v) e incubadas toda la noche a 37° C. Las colonias resistentes a ampicilina fueron raspadas e inoculadas en 3 litros de medio TB (Terrific Broth: 12g/L de triptona; 24g/L de extracto levadura; 4 ml/L de glicerol; 2,31g/L de KH_2PO_4 y 12,54 g/L de K_2HPO_4) con ampicilina y crecidos hasta fase estacionaria. Luego se realizaron 10 preparaciones de DNA plasmidial utilizando el EZNA Plasmid Midiprep Kit, Omega Bio- Tek con 300 ml de cultivo en cada una de las preparaciones.

4.7 Técnicas utilizadas en levaduras

4.7.1.- Preparación de células competentes de *S. cerevisiae*

Las células competentes de levadura se prepararon mediante el método del acetato de litio (Gietz & Schiestl, 1991). Las levaduras fueron crecidas en 50 ml de medio YPD durante 16 horas a 30° C y agitación de 250 rpm. Al día siguiente se inocularon 300 ml de medio YPD con este cultivo hasta llegar a una D.O₆₀₀ de 0,2-0,3. Luego se incubaron a 30° C con agitación hasta una absorbancia de 0,4-0,6. Una vez alcanzada esta densidad de células se centrifugaron a 2.200 rpm por cinco minutos a temperatura ambiente. El sedimento de levaduras se lavó con agua destilada estéril y se volvió a centrifugar. Esta vez el sedimento fue resuspendido en 1,5 ml de solución estéril de LiAc 0,1 M en tampón TE 1x (Tris 10 mM, pH 7,5 y EDTA 1 mM) recién preparado.

4.7.2.- Transformación de células competentes por estrés térmico

Las transformaciones de células competentes de levadura se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Doman y col., 1991. A 100 µl de levaduras competentes se agregaron 0,1 µg del plasmidio o genoteca y 100 µg de DNA de espermio de salmón. Además se adicionó 0,6 ml de una solución estéril de PEG 40% (p/v); LiAc 0,1 M; TE 1x y se mezcló por agitación usando un vortex. Esta mezcla fue incubada a 30° C por 30 minutos con agitación. Luego de la incubación se agregaron 70 µl de DMSO, mezclando suavemente por inversión. Posteriormente se aplicó un golpe de calor por 15 minutos a 42° C en un baño de agua. Los tubos fueron enfriados en hielo por 2 minutos, para luego centrifugar por un minuto a 14.000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue removido y las levaduras fueron resuspendidas en 50 µl de TE 1x. Estas fueron

plaqueadas en medio mínimo sin uracilo e incubadas a 30° C hasta la aparición de colonias. Una vez terminada esta incubación, las colonias transformantes fueron picadas en duplicados sobre medio mínimo para colocar una placa a 30° C (temperatura permisiva) y otra a 37° C (temperatura restrictiva).

4.7.3.- Extracción de DNA plasmidial de levaduras

Las minipreparaciones de DNA plasmidial de levadura fueron hechas utilizando el EZNA Yeast Plasmid Kit siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.7.4.- Extracción de DNA genómico de levaduras

La extracción de DNA se realizó a partir de 5 ml de un cultivo de noche de levadura silvestre, incubado a 30° C con agitación de 250 rpm. Las células fueron recuperadas centrifugando a 8.000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 500 µl de una solución de Sorbitol 0,9 M / EDTA 0,1 M. La pared celular fue digerida agregando 100 µl de zimoliasa (2mg/ml) e incubando a 37° C por 30 minutos. Los esferoplastos fueron sedimentados por medio de centrifugación a 4.000 rpm por 5 minutos. Luego fueron resuspendidos en 450 µl de una solución Tris- HCl 50 mM, EDTA 20 mM, SDS 1% (p/v) e incubados a 65° C por 15 minutos. El DNA se extrajo dos veces agregando una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y posteriormente con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), recuperando siempre la fase acuosa. La precipitación del DNA se realizó centrifugando a 14.000 rpm por 5 minutos, luego de agregar 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío.

4.7.5.- Extracción de proteínas de levadura para western blot

Para cada una de las cepas se inocularon 5 ml de medio mínimo o completo y se incubaron a 30° C por 16 horas con agitación de 250 rpm. Al día siguiente se inoculó con este cultivo un matraz que contenía 50 ml de medio YPD y se crecieron a 30° C con agitación hasta llegar a una D.O₆₀₀ de 0,4- 0,6. Se centrifugó en tubos fríos a 1.000 x g por 5 minutos a 4° C, el sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el sedimento en 50 ml de agua fría y estéril. Las levaduras se recuperaron centrifugando nuevamente a 1.000 x g por 5 minutos a 4° C. Esta vez el precipitado se resuspendió en 0,44 ml de tampón de extracción precalentado a 60° C (urea 48% (p/v); SDS 5% (p/v); Tris-HCl 40 mM, pH 6,8; EDTA 0,1 mM; 0,4 mg/ml de azul de bromofenol, además por cada un ml de esta solución se agregaron 10 µl de β-mercaptoetanol; 50 µl de PMSF 0,1 M y 70 µl de una solución inhibidora de proteasas la cual contenía 0,1 mg/ml de pepstatina; leupeptina 0,03 mM y 0,37 mg/ml de aprotinina).

La suspensión celular fue transferida a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml que contenía el equivalente a 80 µl de perlas de vidrio, calentando la muestra a 70° C por diez minutos. Posteriormente se mezcló por medio de vortex durante un minuto y luego se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para precipitar las levaduras intactas y los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio y se hirvió por 5 minutos. Finalmente se cargaron 60 µl del extracto en un gel o se almacenó a -20° C hasta su uso.

4.8 Técnicas utilizadas en Arabidopsis

4.8.1- Extracción de RNA

Para analizar el patrón de expresión del gen At2g23120 mediante la técnica de RT-PCR, se aisló RNA total desde 100 mg de diversos tejidos y estados de desarrollo de Arabidopsis. Para ello se homogeneizó la muestra congelada en nitrógeno líquido con un ml de reactivo Trizol (Gibco BRL). Una vez formada la mezcla homogénea se agregaron 200 µl de cloroformo, mezclando por medio de agitación vigorosa, seguida de una centrifugación a 11.500 rpm por 15 minutos a 4° C para lograr la separación de las fases orgánica y acuosa. Esta última, que contiene el RNA, se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio que contenía 500 µl de isopropanol y se mezcló por inversión. Luego de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 11.500 rpm por 15 minutos a 4° C. El RNA precipitado se lavó con una solución de etanol al 75% (v/v) (tratado con DEPC) agitando por medio de vortex y recuperando el precipitado por medio de centrifugación. El sobrenadante fue eliminado y el RNA se dejó secar manteniendo los tubos abiertos e invertidos por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el RNA fue disuelto en agua tratada con DEPC.

4.8.2- Inmunolocalización

La inmunolocalización en plantas de Arabidopsis se preparó siguiendo el protocolo descrito por Friml y col., 2003 con algunas modificaciones como se muestra a continuación: plántulas de 4 días fueron fijadas en paraformaldehído 4% (p/v) en MTBS (Pipes 50 mM; EGTA 5 mM; MgSO₄ 5 mM, pH 7) por una hora. Las muestras se lavaron con Triton 0,1% (v/v) en MTBS por diez minutos y luego con agua destilada

repetiendo tres veces cada lavado. La digestión de la pared celular se realizó incubando por una hora con driselasa 2% (p/v) en MTSB, luego de cinco lavados con Triton 0,1% (v/v) en MTBS se incubó con DMSO 10% (v/v); IGEPAL 3% (v/v) en MTSB por una hora. Se lavó la muestra cinco veces por diez minutos con Triton 0,1% (v/v) en MTBS. Las plántulas fueron bloqueadas con una solución de BSA 2% (p/v) en MTSB por una hora a 37° C, para luego ser incubadas con el anticuerpo primario en solución de bloqueo toda la noche a 37° C. Luego de ocho lavados de diez minutos con Triton 0,1% (v/v) en MTSB se incubó con el anticuerpo secundario en BSA 3% (p/v) en MTSB por tres horas a 37° C en oscuridad. Finalmente se lavó 5 veces por diez minutos con Triton 0,1% (v/v) en MTBS y 5 veces por diez minutos con agua destilada. La muestra fue montada en agua sobre un porta objeto y observada en el microscopio confocal Meta Zeiss LSM 510 con un láser de excitación de 488 nm. Los controles negativos se realizaron usando el mismo protocolo, pero sin la incubación con el anticuerpo primario.

4.9 Técnicas generales de biología molecular

4.9.1- Preparación de células competentes de *E.coli*

Las células competentes de *E. coli* se prepararon según el procedimiento descrito por Inoue y col., 1990. A partir de una colonia individual de *E. coli* DH5 α , se inocularon 5 ml de medio LB y se incubó a 37° C por 16 horas con una agitación de 250 rpm. Al día siguiente se agregó un ml de este cultivo a un matraz que contenía 250 ml de medio LB y se creció a 25° C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600nm. A continuación el cultivo se incubó en hielo por diez minutos. Al finalizar este tiempo se colectaron las células centrifugando a 2.500 x g por diez minutos a 4° C.

Las células fueron resuspendidas en 80 ml de tampón TB preenfriado (Pipes 10 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM; ajustado a pH 6,7 con KOH 5 M, para luego adicionar MnCl₂ 55 mM). Se incubó en hielo por diez minutos, luego se centrifugo a 2.500 x g por diez minutos a 4° C. El precipitado se resuspendió en 20 ml de tampón TB frío y se adicionó DMSO hasta una concentración final de 7%. Las células competentes fueron alicuotadas en tubos de microcentrifuga estériles y fríos en volúmenes de 200 µl, congelándolos inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80° C.

4.9.2- Transformación de células competentes de *E.coli*

A 50 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo se agregaron 10 ng del vector. Se incubó en hielo por treinta minutos, posteriormente el tubo que contiene las células se traspasó a un baño a 42 ° C por 45 segundos para producir el estrés térmico y luego fueron enfriadas en hielo por dos minutos. A continuación se agregó 1 ml de medio LB y se incubaron las bacterias por 1 hora a 37° C con una agitación de 250 rpm. Al finalizar este período de incubación, se colectaron las células por centrifugación durante 1 minuto a 14.000 rpm, descartando el sobrenadante y dejando un volumen remanente (aproximadamente de 50 µl) en el cual fueron resuspendidas las células. Este volumen fue plaqueado en LB-agar, suplementado con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37° C por 12 horas. Si el plasmidio utilizado para la transformación fue pGEM-T, previamente se adicionaron 40 µl de X-gal (20 mg/ml) y 4 µl de IPTG 20% (p/v) a las placas.

4.9.3- Minipreparación de DNA plasmidial de *E.coli*

Para la obtención de DNA plasmidial de un clon de interés, este se creció en 3 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, durante 16 horas a 37° C y con agitación de 250 rpm. Luego de la incubación, se centrifugó 1,5 ml del cultivo por un minuto a 14.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, dejando 50 µl para resuspender el sedimento por agitación mediante vortex. Posteriormente se agregaron 300 µl de TENS (Tris 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; NaOH 0,1 N; SDS 0,5% (p/v)) y se agitó por 2-5 segundos usando un vortex. Se añadieron 150 µl de NaAc 3 M , pH 5,2 y se homogenizó vigorosamente durante 2-5 segundos. Esta mezcla se centrifugó por dos minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante fue recuperado cuidadosamente, evitando remover el precipitado, y se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio. El DNA plasmidial se precipitó agregando 0,8 ml de etanol absoluto frío, agitando suavemente mediante cinco inversiones del tubo. Se centrifugó por dos minutos a 14.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con 1 ml de etanol frío al 80%. Luego, el precipitado fue secado invirtiendo el tubo sobre un trozo de papel absorbente por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 20-30 µl de agua tratada con Ribonucleasa A (Fermentas).

4.9.4- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles para correr muestras de DNA fueron preparados con agarosa al 1% en tampón TAE 1x (Tris acetato 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8). Una vez disuelta la agarosa en el horno de microondas se agregó 0,2 µg/ml de bromuro de etidio. A las muestras se adicionó tampón de carga 6x (azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilen cianol 0,25% (p/v))

y glicerol 30% (v/v)) hasta una concentración final de 1x. Como estándar de peso molecular se cargaron 100 ng de 1 Kb DNA Ruler (Fermentas). Las electroforesis se corrieron a 80-100 volts durante 30 minutos aproximadamente, utilizando una fuente de poder Power Pac 300 de BioRad.

4.9.5- Digestión de DNA con endonucleasas de restricción

Las digestiones se realizaron usando dos unidades de enzima por cada 0,5 µg de DNA, agregando el tampón correspondiente a la enzima a una concentración final de 1x. Las incubaciones fueron de a lo menos una hora a la temperatura óptima para cada enzima de restricción.

4.9.6- Ligación de DNA utilizando T4 DNA ligasa

Las ligaciones de un fragmento de DNA a un vector linearizado, se realizaron en una proporción de 3:1 respectivamente. Se utilizaron 5 unidades de T4 DNA ligasa (Fermentas) en un volumen de reacción de 10 µl, incubando por 16 horas a 4° C.

4.9.7- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se prepararon agregando 1 µl de templado (diluido 100 veces si es que provenía de minipreparación o de una reacción de transcripción reversa); 0,5 µl de cada partidor (solución stock 10 µM); 2,5 µl tampón PCR 10x; 2,5 µl de dNTPs (2 mM); 0,8 µl de MgCl₂ (50 mM); 0,3 µl Taq polimerasa (5u/µl) y agua hasta completar los 25 µl.

Las condiciones del PCR fueron específicas para cada reacción, conservando siempre la temperatura de extensión (72° C) y de denaturación (95° C). La variación se presentó en

las temperaturas de hibridación (ver tabla 3) y los tiempos de extensión (1 minuto por kb). El termociclador utilizado fue el MyCycler de BioRad.

4.9.8- Secuenciación

Las secuenciaciones fueron realizadas por Macrogen, Corea (www.macrogen.com) mediante el secuenciador ABI3730XL.

4.9.9- Western blot

Los geles fueron preparados usando el sistema de soporte Mini Protean II Cell, BioRad. Para preparar 10 ml del gel separador al 10% se mezcló: 3,3 ml de una solución de acrilamida al 30% (p/v)/ bis-acrilamida al 0,8% (p/v); 2,5 ml de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 4,1 ml de agua; 100 µl de SDS 10% (p/v); 100 µl de PSA 10% (p/v) y 10 µl de TEMED. Una vez polimerizado este gel se preparó la mezcla para el gel concentrador.

Para preparar 5 ml del gel concentrador al 3% se mezcló: 0,5 ml de una solución de acrilamida al 30% (p/v)/ bis-acrilamida al 0,8% (p/v); 1,25 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 3,25 ml de agua; 50 µl de SDS 10% (p/v); 50 µl de PSA 10% (p/v) y 5 µl de TEMED.

Una vez polimerizado el gel fue cargado en una cámara BioRad Mini Protean II y corrido a 100 volts usando una fuente de poder Power Pac 300 (BioRad), en tampón de corrida 1x para geles SDS (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v)).

La transferencia se hizo ensamblando el cassette "sandwich" con orientación de cátodo a ánodo de la siguiente manera: esponja, sobre esta 3 papeles filtro, luego el gel, sobre este la membrana de PVDF (Millipore) previamente activada en metanol, 3 papeles filtros

más y una esponja. La transferencia se realizó a 0,35 amper por 1 hora usando una fuente de poder Power Pac 200 (BioRad).

Luego la membrana fue bloqueada toda la noche a 4° C en una solución BSA 2% (p/v) en T-PBS (NaH₂PO₄ 230 mM; NaCl 1 M; Na₂HPO₄ 0,8 M; Tween-20 0,05% (v/v)).

Luego de 2 lavados con T-PBS por diez minutos cada uno, se incubó la membrana por 2 horas a temperatura ambiente con el primer anticuerpo diluido en BSA 2% (p/v) en T-PBS. Se lavó tres veces con T-PBS por diez minutos y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente, seguido por tres lavados con T-PBS por diez minutos. Luego la membrana se puso en contacto por un minuto con 10 ml de una solución que contiene Tris 100 mM, pH 8,5; 50 µl de luminol; 20 µl de ácido cumárico 90 mM y 3 µl de peróxido de hidrógeno. Luego la membrana fue expuesta con una película fotosensible por un tiempo variable (entre 1 a 5 minutos) y revelada.

4.9.10- RT-PCR

Se utilizó 1 µg de RNA total como templado para las reacciones de transcripción reversa. El control negativo de la reacción de transcripción contenía todos los componentes a excepción de la transcriptasa. Se utilizó el kit ImPromII Reverse Transcription System de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cDNAs generados luego de la reacción de transcripción reversa, se diluyeron 100 veces para utilizar 1 ul de esta dilución como templado en la reacción de PCR. Los partidores AtC-R y F utilizados para detectar el cDNA del gen At2g23120 generan un fragmento de 244 pb.

4.9.11- Cuantificación de proteínas por BCA

Antes de proceder a la cuantificación de las proteínas fue necesario construir una curva de calibración con BSA en el rango de 0 a 20 ug, desde la cual se interpolaron los valores de concentración de las muestras.

Las mediciones fueron realizadas en una placa de 96 pocillos. Se agregaron 5 ul de cada muestra a un pocillo y se adicionaron 15 ul de agua a cada uno. Luego se agregó a cada muestra 176, 4 ul de BCA (Sigma) y 3,6 ul de una solución $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 4% (p/v). Se incubó a 37° C por 30 minutos y se midió la absorbancia a 596 nm.

4.9.12- Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA se realizó diluyendo 5 ul del volumen total, obtenido luego de la extracción, en 495 ul de agua. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La concentración se calculó mediante la siguiente fórmula: $c = D.O_{260} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{factor de dilución}$. Además se calculó la razón $D.O_{260/280}$ la cual debió estar entre 1,7 – 2, para asegurar la pureza de la muestra.

5. RESULTADOS

5.1 Identificación de secuencias proteicas de *Arabidopsis thaliana* ortólogas a las ocho subunidades del complejo exocyst de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el genoma de *Arabidopsis* existen genes ortólogos de las ocho subunidades del complejo Exocyst de levaduras. La identidad local a nivel de secuencia aminoacídica se encuentra entre el 17 y 30 % y es un poco más baja al comparar las secuencias completas (Tabla 3). Estos valores de identidad no son muy altos, pero son similares a los valores encontrados entre las subunidades del complejo de mamíferos y de levaduras. Debido a la redundancia génica de *Arabidopsis*, cuatro de las subunidades del complejo exocyst de levadura (Sec5, Sec15, Exo70 y Exo84) poseen más de un ortólogo, el caso más extremo es el de la subunidad Exo70 que tiene 22 ortólogos.

Los genes que codifican para estos ortólogos en *Arabidopsis* están descritos como genes que se expresan en la mayoría de los órganos (Cole y col., 2005), pero hasta el momento no poseen función conocida.

Al igual que las subunidades del complejo exocyst de levadura, las proteínas ortólogas en *Arabidopsis* son de gran tamaño (70 a 150 kDa) y en la mayor parte de su secuencia se predicen estructuras secundarias tipo hélice (dato no mostrado).

Tabla 3: Identidad entre los ortólogos de las subunidades del complejo exocyst en Arabidopsis comparado con levaduras.

Subunidad en levaduras (aa) ^a	Ortólogo de Arabidopsis (aa) ^a	% Identidad local/global ^b	% Similitud local/global ^b
Sec3 (1336)	At1g47550 (887)	22 (130)/ 16,1	49 (130)/ 28,3
Sec5 (971)	At1g76850 (1090)	17 (284)/ 15,8	40 (284)/ 32,3
	At1g21170 (1090)	17 (287)/ 16,5	40 (287)/ 32,8
Sec6 (805)	At1g71820 (752)	18 (517)/ 17,5	41 (517)/ 39,9
Sec8 (1065)	At3g10380 (1053)	21 (210)/ 17,4	48 (210)/ 36,2
Sec10 (871)	At5g12370 (858)	28 (181)/ 18,2	49 (181)/ 38,5
Sec15 (910)	At3g56640 (789)	17 (837)/ 18,2	37 (837)/ 39,1
	At4g02350 (771)	18 (406)/ 17	40 (406)/ 38
Exo70 (623)	At5G50380 (683)	21 (394)/ 19,9	39 (394)/ 37,7
	At5G03540 (638)	17 (673)/ 16	35 (673)/ 35,5
	At5G13150 (653)	21 (383)/ 19,1	42 (383)/ 37
	At5G52340 (695)	23 (155)/ 16,8	49 (155)/ 37,8
	At2G39380 (637)	20 (269)/ 16,4	37 (269)/ 35,8
	At5G52350 (547)	35 (74)/ 17,7	62 (74)/ 35,6
	At3G55150 (636)	21 (276)/ 16,7	38 (276)/ 34,4
	At5G58430 (624)	23 (154)/ 16,3	47 (154)/ 35,8
	At3G29400 (658)	24 (155)/ 18,3	45 (155)/ 36,7
	At3G09520 (628)	22 (157)/ 16,6	44 (157)/ 33,9
	At3G14090 (623)	21 (163)/ 16,5	46 (163)/ 35,9
	At5G13990 (695)	26 (76)/ 15,8	56 (76)/ 33,9
	At2G28640 (605)	22 (148)/ 16,9	40 (148)/ 35,4
	At1G72470 (633)	20 (349)/ 16,9	39 (349)/ 35,1
	At1G54090 (622)	20 (150)/ 15,8	44 (150)/ 36,6
	At4G31540 (687)	21 (123)/ 16,9	45 (123)/ 35,8
	At3G09530 (637)	19 (279)/ 16,6	41 (279)/ 34
	At2G28650 (573)	18 (213)/ 17	42 (213)/ 35,5
	At1G07725 (566)	26 (114)/ 17,6	42 (114)/ 35,1
	At1G07000 (600)	28 (78)/ 18,7	52 (78)/ 34,8
At1G51640 (660)	22 (75)/ 16,7	46 (75)/ 36	
At5G59730 (634)	25 (74)/ 17,2	48 (74)/ 33,2	
Exo84 (753)	At1g10385 (754)	40 (176)/ 15,3	46 (176)/ 34,3
	At1g10180 (769)	22 (72)/ 16	49 (72)/ 33,7
	At5g49830 (752)	21 (188)/ 15,3	41 (188)/ 33,3

Los porcentajes de identidad en alineamientos locales se obtuvieron a través de BLAST y los de alineamientos globales mediante Stretcher.

aa: aminoácidos

^a Tamaño de la subunidad en aminoácidos.

^b Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos comparados en el alineamiento local.

5.2 Clonamiento de cuatro cDNAs de *Arabidopsis thaliana*, ortólogos a subunidades del complejo exocyst de levadura, en el vector pGPD-myc.

Los cDNAs correspondientes a los genes de *Arabidopsis* At1g76850, At1g71820, At3g10380 y At5g12370, ortólogos a las subunidades Sec5, Sec6, Sec8 y Sec10 del complejo exocyst respectivamente, fueron clonados en el vector de expresión para levaduras pGPD-myc (Tabla 4) bajo el promotor constitutivo de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y fusionado al epítoto myc por el extremo 3'. Esta elección arbitraria de los cDNAs se debió a dos razones principales. La primera consiste en la limitación de mutantes de levadura disponibles, ya que sólo contábamos con mutantes para seis de las ocho subunidades del complejo. La segunda razón fue que poseíamos los clones que contenían los cDNAs completos para estos genes de *Arabidopsis*, lo cual facilitaba su amplificación y posterior clonación.

Tabla 4: Vectores para la complementación de mutantes secretorios de levadura.

Nombre constructo	Inserto	Largo del inserto (pb)
pGPDAAtSec5-myc	cDNA completo At1g76850	3.273
pGPDAAtSec6-myc	cDNA completo At1g71820	2.259
pGPDAAtSec8-myc	cDNA completo At3g10380	3.169
pGPDAAtSec10-myc	cDNA completo At5g12370	2.490

Para verificar la clonación de los cDNAs de los genes At1g76850, At1g71820, At3g10380 y At5g12370 de *Arabidopsis* en el vector p426GPD-myc, se amplificaron los insertos mediante PCR desde cada uno de los constructos. Se utilizaron partidores específicos para cada cDNA: AtS5-F y R; AtS6-F y R; AtS8-F y R; AtS10-F y R respectivamente. Las bandas obtenidas como resultado del PCR corresponden a los

tamaños de los cDNAs completos y se muestran en la Figura 2A. En paralelo se realizó una digestión de los constructos con enzimas de restricción que liberan el inserto desde el vector, estos resultados se observan en la Figura 2B. Luego los insertos fueron secuenciados desde los extremos 3' y 5' corroborando que las secuencias corresponden a los cDNAs de los genes At1g76850, At1g71820, At3g10380 y At5g12370 (dato no mostrado).

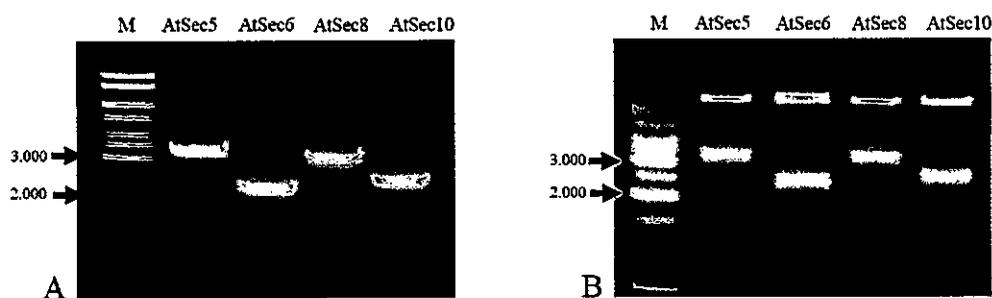


Figura 2: Verificación de la clonación de los cDNAs ortólogos de las subunidades Sec5, 6, 8 y 10 de *Arabidopsis* en el vector pGPD-myc. A. Electroforesis de las reacciones de PCR que amplifican los cDNAs completos mediante partidores específicos para cada gen. B. Electroforesis de digestiones dobles con enzimas de restricción que liberan el inserto. M: Marcador de peso molecular en pb.

5.3 Complementación de levaduras mutantes secretorios termosensibles con los vectores de expresión pGPDA_tSec-myc.

Se transformaron las cepas mutantes termosensibles de levaduras NY402 (*sec5-24*), NY17 (*sec6-4*), NY410 (*sec8-9*) y NY61 (*sec10-2*) con los vectores pGPDA_tSec5-myc, pGPDA_tSec6-myc, pGPDA_tSec8-myc y pGPDA_tSec10-myc respectivamente. Las levaduras transformadas se plaquearon en medio mínimo y fueron incubados a 30° C por 2 días. Luego se repicaron en duplicado 100 colonias de cada placa y se incubaron a 30°

C (temperatura permisiva) y 37° C (temperatura restrictiva) respectivamente. Como era esperado en todas las placas incubadas a 30° C hubo crecimiento de las colonias correspondientes a levaduras silvestres, mutantes transformados con el vector vacío y mutantes transformados con los constructos (Figura 3 A, C, E y G). Esto no se observó en las placas incubadas a 37° C (Figura 3 B, D, F y H), donde sólo crecieron las colonias que corresponden a levaduras silvestres, dejando en evidencia la incapacidad de los cDNAs de Arabidopsis para complementar los fenotipos mutantes.

Para descartar que la falta de crecimiento de los transformantes se debe a la ausencia de expresión de las proteínas codificadas por los cDNAs de Arabidopsis, se realizó un Western blot utilizando anticuerpos contra el epítopo myc (fusionado al extremo carboxilo terminal de las proteínas). Para ello se extrajeron proteínas totales de dos transformantes de cada cepa mutante, además de la cepa silvestre y los mutantes transformados con el vector vacío.

En la Figura 4, vemos que el anticuerpo reconoce una banda del tamaño esperado en los carriles correspondientes a los transformantes 1 y 2. Esto era 125, 89, 120 y 97 kDa en los extractos proteicos de levaduras mutantes NY402, NY17, NY410 y NY61. En todos los casos no se observa banda en el carril correspondiente a las proteínas de la mutante no transformada ni a la transformada con el vector vacío. Estos resultados demuestran que la falta de complementación de los mutantes a temperatura restrictiva no se debe a que los cDNAs no estén siendo traducidos a proteína por la maquinaria celular de las levaduras.

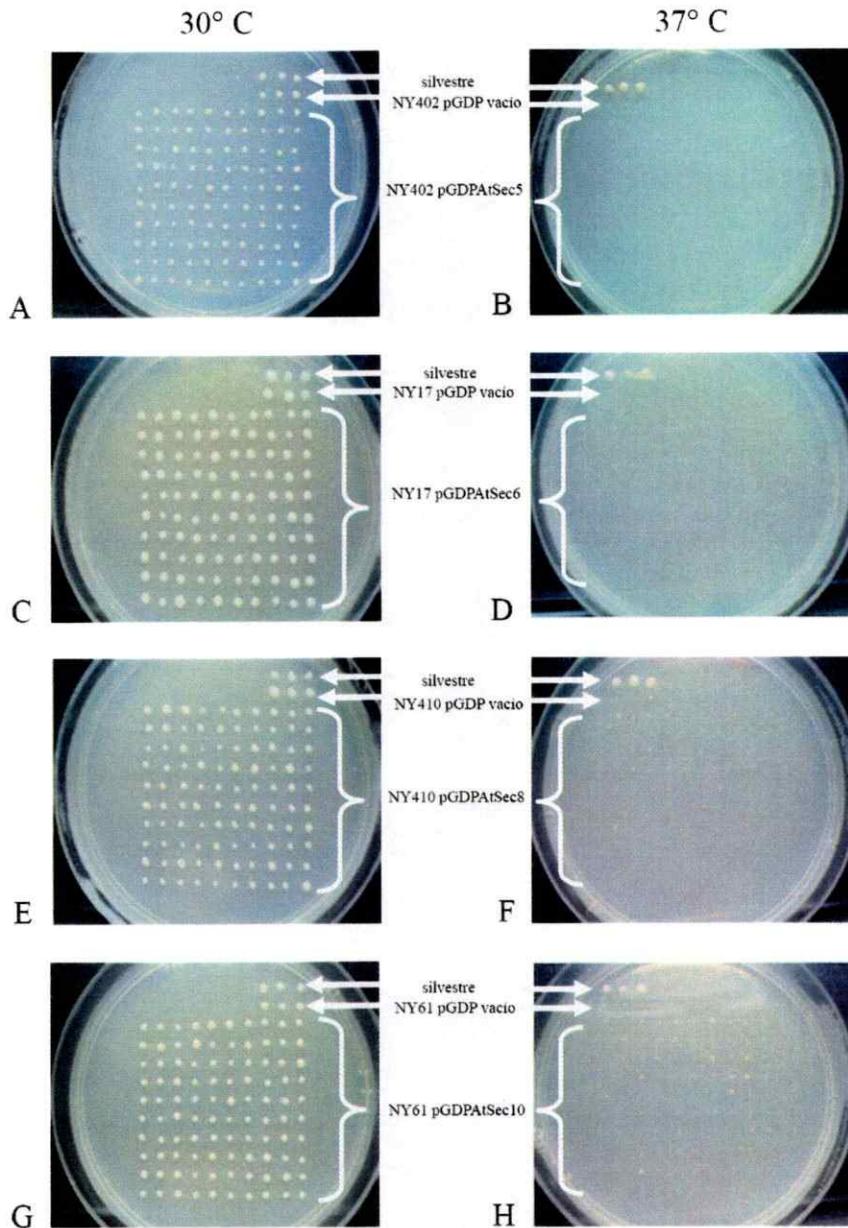


Figura 3: Complementación de mutantes Sec. En todas las placas, la fila superior corresponde a levaduras silvestres, la segunda al mutante transformado con el vector vacío y el resto a mutantes transformadas con el constructo. Las placas A, C, E y G fueron incubadas a temperatura permisiva (30° C) y las placas B, D, F y H a temperatura restrictiva (37° C). NY402: mutante en Sec5, NY17: mutante en Sec6, NY410: mutante en Sec8 y NY61: mutante en Sec10.

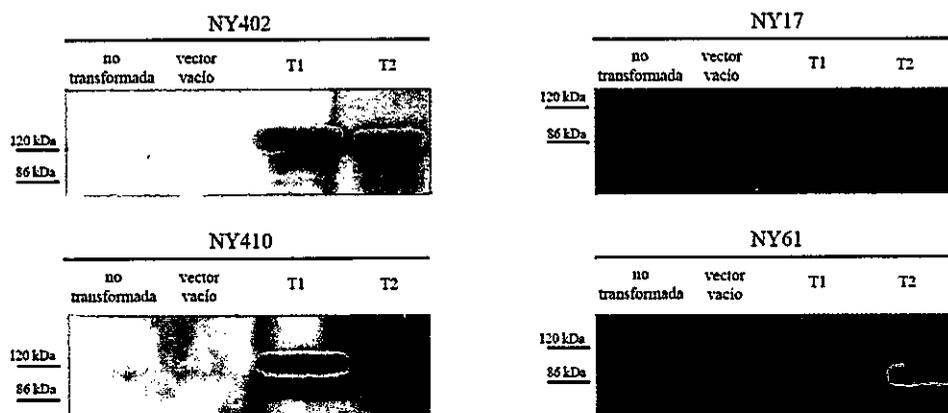


Figura 4: Expresión de las proteínas codificadas por los cDNAs de *Arabidopsis* en los mutantes de levadura. La detección de los productos proteicos se realizó hibridizando las membranas con un anticuerpo anti myc. En todos los mutantes transformados (T1 y T2) con los constructos que contenían las fusiones cDNA-myc se observó acumulación de los productos proteicos, no así en los extractos provenientes de levaduras mutantes sin transformar y transformadas con el vector vacío. NY402: mutante en Sec5, NY17: mutante en Sec6, NY410: mutante en Sec8 y NY61: mutante en Sec10.

5.4 Complementación de levaduras mutantes secretorios termosensibles con una genoteca de *Arabidopsis thaliana*.

Pese a la incapacidad de los cuatro cDNAs de *Arabidopsis* para complementar las deficiencias secretorias en los mutantes de *S. cerevisiae*, quisimos probar la posibilidad de que otra proteína complementara dicha función. Se realizó el mismo experimento de complementación utilizando la genoteca pYES de *Arabidopsis*. Esta vez se transformaron todas las cepas mutantes termosensibles del complejo exocyst que poseíamos: NY402 (sec5-24), NY17 (sec6-4), NY410 (sec8-9) y NY61 (sec10-2), NY412 (sec3-2), NY64 (sec15-1). También se incluyó la cepa NY405 (sec4-8) que

posee una mutación en la Rab GTPasa asociada al complejo Exocyst y la cepa NY130 (sec2-41) que presenta deficiencia en la proteína GEF de la GTPasa Sec4.

Las células transformadas se plaquearon en medio mínimo, fueron incubadas a 30° C por 2 días y luego por otros 2 días a 37° C. Se repicaron en duplicado las 100 colonias de cada placa que parecían tener un mayor crecimiento luego de la incubación a 37° C y se incubaron a 30° C y 37° C respectivamente para confirmar la reversión del fenotipo mutante. Sólo se encontró un transformante de la cepa NY402 (sec5-24) capaz de crecer a la temperatura restrictiva (Figura 5B).

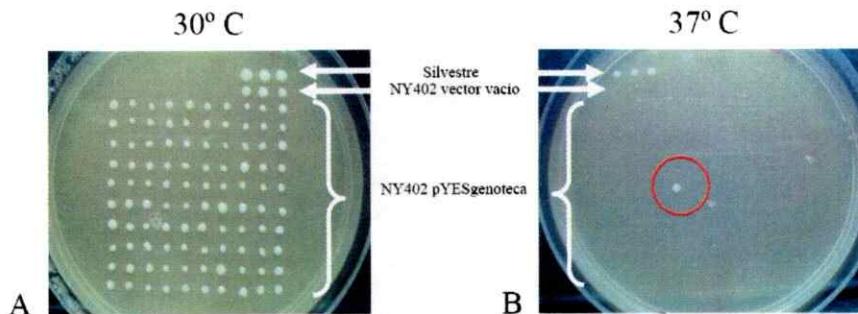


Figura 5: Complementación del fenotipo mutante de la cepa NY402 (sec5-24).

A. Células silvestres (fila superior), células NY402 transformadas con el vector vacío (segunda fila) y células NY402 transformadas con la genoteca pYES (tercera fila en adelante) incubados a temperatura permisiva (30° C). B. Duplicado de la placa A incubada a la temperatura restrictiva. Se destaca con un círculo rojo un transformante de la cepa NY402 que revierte el fenotipo mutante.

Para estudiar en detalle la cinética de crecimiento del transformante complementado de la cepa NY402 se realizó una curva de crecimiento a temperatura permisiva y restrictiva, incluyendo además la cepa silvestre, el mutante transformado con el vector vacío y el mutante transformado con un vector que contenía el gen Sec5 silvestre. Cada medición se realizó en duplicado, pero no se observó variabilidad (no mostrado). En la Figura 6A

vemos que el crecimiento a 30° C de los cuatro cultivos es similar, ya que el fenotipo mutante no se manifiesta. A 37° C (Figura 6B) observamos que el mutante complementado crece de manera similar a la cepa silvestre y al mutante transformado con el gen endógeno, siendo el mutante transformado con el vector vacío el único cultivo que presenta el fenotipo mutante (reflejado en la baja densidad óptica).

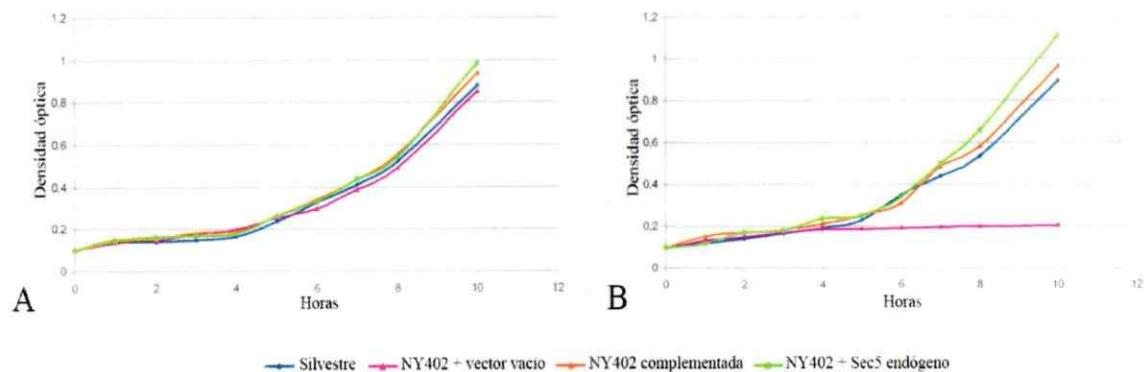


Figura 6: Curva de crecimiento de levaduras. A. Crecimiento a temperatura permisiva (30° C) de cuatro cultivos de levaduras: silvestre, NY402 transformada con el vector pGPD-myc vacío, NY402 complementada por la genoteca pYES y NY402 transformada con el vector pGPDSec5-myc (contiene el gen endógeno de *S. cerevisiae*). B. Crecimiento de los mismos cuatro cultivos a temperatura restrictiva (37° C).

Para examinar si en este mutante complementado por la genoteca no sólo se revertía el defecto en la yemación (manifestado como crecimiento a 37°C) sino que además el defecto secretorio, se realizó el ensayo de secreción de la invertasa (codificada por Suc2). La actividad invertasa extracelular de las levaduras puede ser detectada por el cambio de color sobre un medio de crecimiento que contenga verde de bromocresol (indicador de pH) y sacarosa. En la Figura 7 se observa que la cepa silvestre incubada a temperatura permisiva, así como a la temperatura restrictiva es capaz de degradar la

sacarosa presente en el medio y provocar un cambio de pH que se ve reflejado en el color amarillo alrededor de la colonia. El mutante NY402 complementado por la genoteca pYES recupera el fenotipo silvestre a la temperatura restrictiva, no así el mutante NY402 transformado con el vector vacío, confirmando el defecto en su maquinaria secretoria a 37° C.

El vector contenido en este transformante NY402 complementado por la genoteca, se nombrará como pYES5c de ahora en adelante.

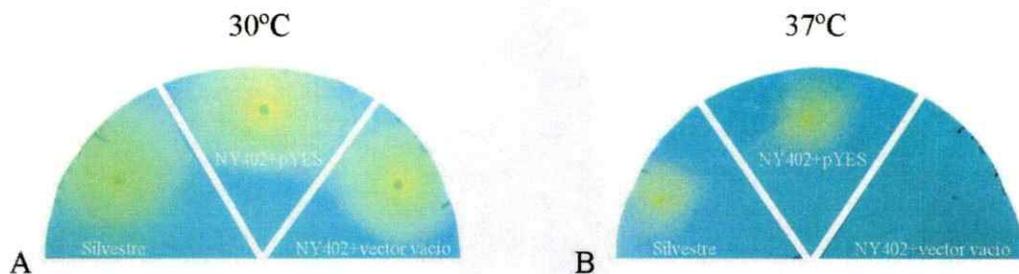


Figura 7: Complementación de la actividad secretoria de la cepa NY402 (sec5-24).

A. Células silvestres, células NY402 transformadas con el vector vacío y células NY402 del transformante complementado con la genoteca λ YES poseen actividad invertasa a la temperatura permisiva. B. Duplicado de la placa A incubada a la temperatura restrictiva.

Es necesario demostrar que la incorporación del vector pYES5c reestablece el fenotipo silvestre en la cepa NY402. Para esto se recuperó el vector contenido en la cepa complementada mediante una minipreparación de DNA plasmidial y se retransformaron células competentes del mutante NY402. Una elevada proporción (60%) de los transformantes presentaron crecimiento a la temperatura restrictiva (dato no mostrado). Esto confirmó que la recuperación del fenotipo silvestre en la cepa mutante solamente se debía a la incorporación del vector pYES5c.

5.5 Clonación en pGEM y secuenciación del fragmento recuperado desde el mutante Sec5 de *Saccharomyces cerevisiae*.

El cDNA que reestablece la capacidad de yemación y secreción de la invertasa fue recuperado desde el vector pYES5c. Debido a que la genoteca λ YES se construyó clonando los cDNAs de Arabidopsis entre dos sitios de restricción para la endonucleasa EcoRI, el fragmento fue recuperado digiriendo el vector con esta enzima. Este fragmento de aproximadamente 550 pb (Figura 8A) fue subclonado en el vector pGEM cortado con EcoRI, para posteriormente secuenciarlo utilizando las secuencias de los partidores universales M13 contenidas en el vector.

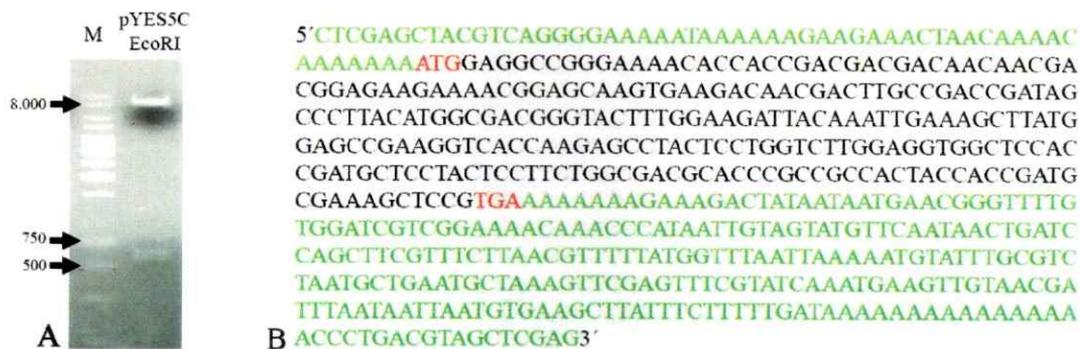


Figura 8: Identificación del cDNA contenido en el vector pYES5c. A. Digestión del vector con la enzima EcoRI libera un fragmento de 550 pb aproximadamente. B. Resultado de la secuenciación del fragmento, correspondiente al cDNA completo del gen At2g23120, el cual contiene los UTR (en verde) y el ORF. En rojo se destacan los codones de inicio y de término. M: Marcador de peso molecular en pb.

La secuenciación del fragmento dio como resultado una secuencia de 562 pares de bases (Figura 8B). Al realizar un alineamiento de esta secuencia contra la base de datos de Arabidopsis utilizando la herramienta BLASTn, se obtuvo como resultado que este fragmento de DNA correspondía a las secuencias 5'UTR, ORF y 3'UTR del gen

At2g23120, cuya función es desconocida. El fragmento no muestra similitud con alguno de los dos genes ortólogos de Arabidopsis para la subunidad Sec5 del complejo exocyst. La secuencia nucleotídica codifica una proteína de 83 aminoácidos con una masa molecular calculada de 9 kDa.

Al realizar un BLASTp con la misma secuencia aminoacídica codificada por este gen, utilizando la base de datos de NCBI se encontró que esta secuencia posee ortólogos en otras especies vegetales, descritos como proteínas del tipo LEA. Algunos de estos ortólogos son PvLEA-18 de *Phaseolus vulgaris* y PM21 de *Glycine max* (Figura 9).

```

PvLEA-18      MKRKME----KEKTESEQ--GKVNLEGLPTEDSPYVKYKDLEDYKQQGYGTQGHQEPKT 54
PM21          MEKQQQQAPSKETKAQSDSEVKESSTEGLPMEDSPYVKYKDLEDYKRYGYGTQGHQEPKT 60
At2g23120    MEAGKTP---PTTTTTEKKTEQVKDNDLPT-DSFYMATGTLEDYKLYKAYGAEGHQEPTP 56
              *:          ..: :::  : . :.*  ****:  ***** :.***:*****..

PvLEA-18      GRGAGATEAPTLSGAAFSSKSQATGTGATNHK--- 86
PM21          GRGAGATEAPTLSGAAVSSDAQVAATDAINSKGVP 95
At2g23120    GLGGGSTDAPTPSGDAPAATTTDAKAP----- 83
              * *.**:*:*** ** * :: :  : :

```

Figura 9: Alineamiento mediante ClustalW de la secuencia aminoacídica codificada por el gen At2g23120 y las proteínas con las que presenta mayor homología: PvLEA-18 de *Phaseolus vulgaris* y PM21 de *Glycine max*. Los asteriscos (*) indican los aminoácidos conservados en las tres secuencias. Los dos puntos (:) sustitución conservada y el punto (.) sustitución semiconservada entre los aminoácidos de esa posición.

Además el gen At2g23120 posee dos homólogos dentro del genoma de Arabidopsis. Uno es el gen At2g23110, el cual se encuentra inmediatamente río arriba de este y con el cual comparte un 54% de su secuencia aminoacídica y un 83% de su secuencia nucleotídica, diferenciándose sólo por las secuencias no traducidas. El otro homólogo es el gen At2g33690, el cual es 51% idéntico a nivel aminoacídico, pero posee una baja identidad al comparar las secuencias nucleotídicas (33%). Ninguno de estos genes posee función conocida.

5.6 Análisis del patrón de expresión del gen At2g23120.

El análisis de expresión del gen At2g23120 se realizó mediante RT-PCR a partir de RNA total de plantas de Arabidopsis Col-0 completas en distintos estados de desarrollo y de cinco órganos de plantas adultas. Los partidores utilizados fueron AtC-F y AtC-R que reconocen una zona exclusiva del gen At2g23120 que incluye parte del 3'UTR y amplifican un fragmento de 244 pb. En la Figura 10 A y B vemos que el gen At2g23120 se expresa en todos los órganos, con mayor fuerza en tallo, flor y raíz. Esto coincide con los datos de expresión *in silico* donde vemos una mayor expresión del gen en estos órganos comparado con su expresión en hoja caulinar u hoja joven de roseta (Figura 10C, barras negras). En la Figura 11 A y B se observa una expresión baja en los estadios correspondientes a plántulas de 4 y 8 días, luego un aumento en la expresión a los 12, 15 y una caída en el día 21. Al analizar la expresión *in silico* del gen At2g23120 vemos este mismo comportamiento, ya que el aumento en la expresión se observa en plántulas de 14 a 18 días y la caída en la expresión se detectó entre los 21 a 25 días (Figura 11C, barras negras). El máximo de expresión se observa en plantas adultas con flor y silicuas maduras. Un nivel de expresión muy distinto posee el gen At2g23110 (homólogo del gen At2g23120), expresándose únicamente en semillas (Figura 10C, barras rojas) y en etapas muy determinadas dentro del desarrollo de Arabidopsis (Figura 11C, barras rojas), sugiriendo que no tendrían un rol redundante en el desarrollo de Arabidopsis.

Para determinar si la expresión del gen At2g23120 es constitutiva o más bien regulada durante el desarrollo de Arabidopsis se incluyó el análisis de expresión del gen actina. El RT-PCR da cuenta de una expresión fuerte y mantenida en los distintos órganos (Figura 10A) y estadios de desarrollo (Figura 11A). Debido a que los partidores utilizados

reconocen a lo menos ocho isoformas de actina, no es posible hacer una comparación muy exacta. El análisis *in silico* del gen Actina 7, el cual presenta una expresión fuerte en casi la mayoría de los órganos (Figura 10D) y estadios de desarrollo de la planta (Figura 11D) permite sugerir que la expresión del At2g23120 podría estar siendo regulada durante el desarrollo.

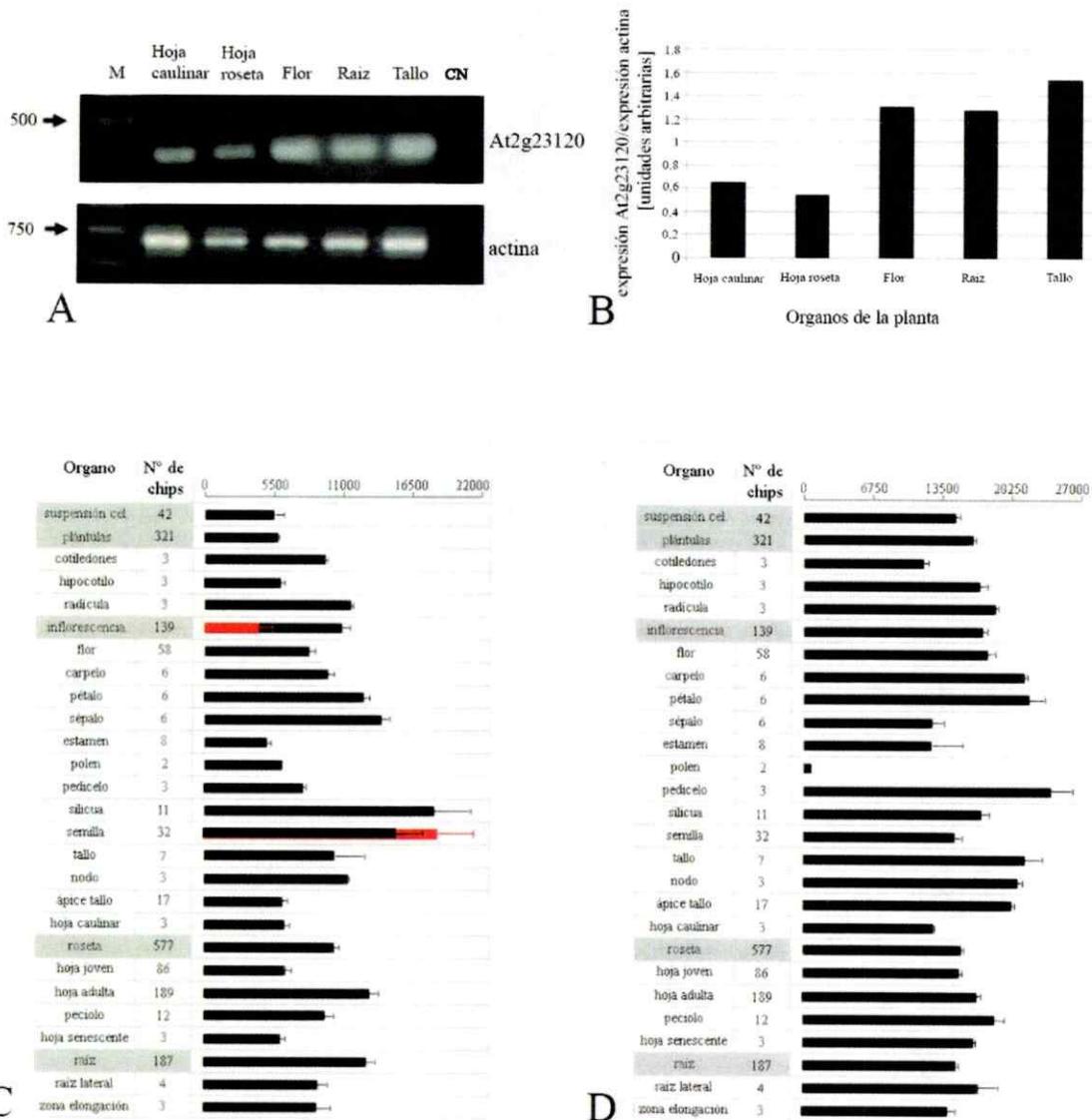


Figura 10: Patrón de expresión del gen At2g23120 en distintos órganos de *Arabidopsis thaliana*. A. RT-PCR del gen At2g23120 y del gen actina utilizando como templado 1 µg de RNA total de *Arabidopsis*. B. Gráfico de las razones entre la expresión del gen At2g23120 y del gen actina. C. Expresión *in silico* de los genes At2g23120 (barras negras) y At2g23110 (barras rojas) utilizando la herramienta Gene Atlas de la base de datos Genevestigator. D. Expresión *in silico* del gen actina. M: Marcador de peso molecular en pb. CN: Control negativo (sin transcriptasa). At2g23120: gen de tipo LEA, que complementa al mutante NY402 (sec5-24) de levadura. At2g23110: homólogo al gen At2g23120.

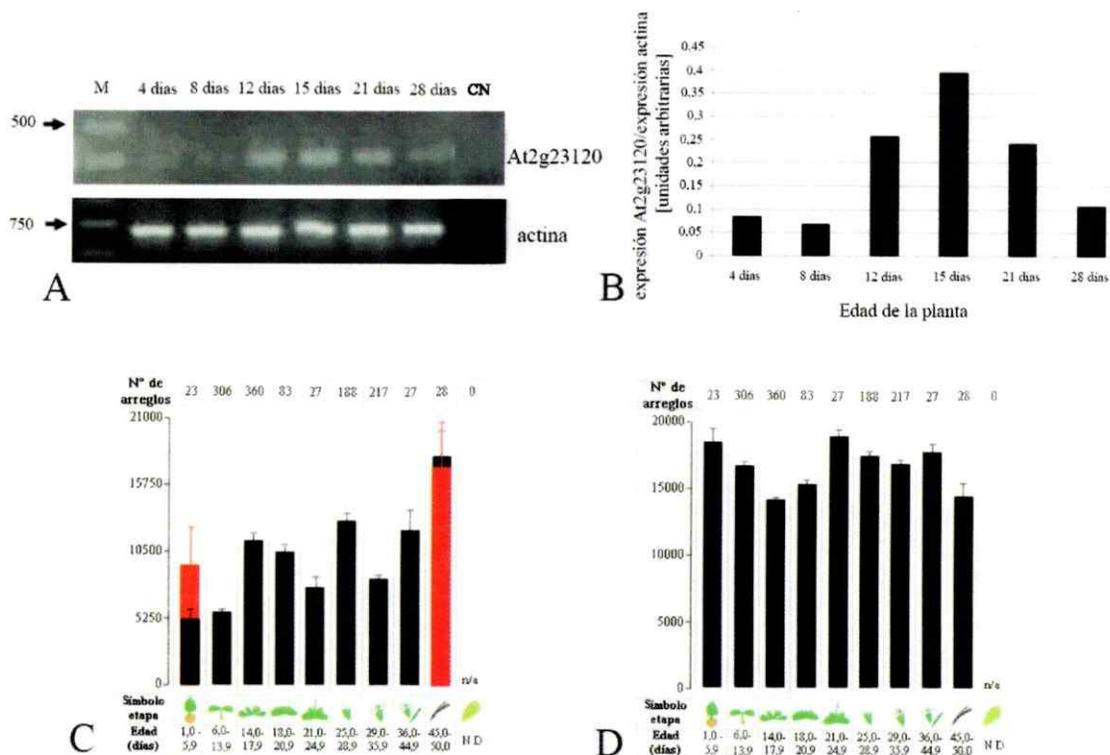


Figura 11: Patrón de expresión del gen At2g23120 en distintas etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. A. RT-PCR del gen At2g23120 utilizando como templado 1 µg de RNA total de *Arabidopsis*. B. Gráfico de las razones entre la expresión del gen At2g23120 y del gen actina. C. Expresión *in silico* usando la herramienta Gene Chronologer de la base de datos Genevestigator del gen At2g23120 (barras negras) y At2g23110 (barras rojas) D. Expresión *in silico* usando la herramienta Gene Chronologer del gen actina 7. M: Marcador de peso molecular en pb. CN: Control negativo (sin transcriptasa). At2g23120: gen de tipo LEA, que complementa al mutante NY402 (sec5-24) de levadura. At2g23110: homólogo al gen At2g23120.

Una manera de aproximarse a la posible función que posee un gen dentro de un organismo es analizando la inducción o represión de su expresión bajo distintos tratamientos de estrés. La expresión del gen At2g23120 fue analizada *in silico* a través de Genevestigator usando la aplicación Response Viewer. El gen At2g23120 muestra una inducción en tratamientos con isoxabeno (herbicida, inhibidor de la síntesis de celulosa), ABA (ácido abscísico), carencia de potasio, frío y estrés osmótico. Una represión de la expresión se observa en tratamiento con altos niveles de CO₂, cicloheximida (inhibidor de síntesis proteica), TIBA (inhibidor del transporte de auxina), ácido salicílico, carencia de nitrógeno, sequedad, genotóxicos y estrés oxidativo.

Los análisis de co-respuesta también pueden aportar una aproximación en la búsqueda del rol celular de un gen, basándose en el supuesto de que distintos genes involucrados en un mismo proceso poseen un control transcripcional común que puede estar acompañado de cambios sincronizados de sus niveles de transcripción. Por lo tanto, la búsqueda de los mejores valores de co-respuesta en los niveles de transcripción permite deducir que estos genes poseen una regulación común. El análisis del gen At2g23120 (Tabla 5) se hizo utilizando CSB.DB que es un conjunto de bases de datos de co-respuesta, basada en perfiles de expresión públicos.

Tabla 5: Genes que coexpresan de forma positiva (aumentan su expresión) junto a At2g23120 durante el desarrollo de Arabidopsis.

Valor coeficiente Spearman*	Gen	Función
0,7039	At4g18280	Proteína relacionada a pared celular rica en glicina
0,6788	At5g65470	Proteína que contiene similitud con un promotor de crecimiento independiente de auxina
0,6749	At3g45970	Proteína de la familia de expansina (EXPL1)
0,6535	At2g17840	Proteína relacionada a senescencia/deshidratación (ERD7)
0,6450	At1g18210	Putativa proteína de unión a calcio
0,6309	At3g03750	Proteína con dominio SET
0,6279	At2g17430	Hidrolasa
0,6246	At2g35290	Proteína expresada
0,6227	At3g58790	Proteína perteneciente a la familia 8 de las glicosil transferasas
0,6043	At1g15010	Proteína expresada
0,6041	At1g71950	Proteína expresada
0,6026	At2g27260	Proteína expresada
0,6022	At1g72790	Proteína de la familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas
0,5974	At4g39840	Proteína expresada
0,5874	At1g17620	Proteína expresada
0,5858	At1g01470	Proteína abundante en embriogénesis tardía (LEA)
0,5786	At4g05050	Proteína similar a poliubiquitina (UBQ)
0,5744	At1g27330	Proteína expresada, contiene un dominio de transmembrana, similar a proteína de membrana asociada a ribosoma (RAMP4)
0,5610	At1g75860	Proteína expresada
0,5601	At4g16500	Proteína similar al inhibidor de cisteína proteinasa
0,5591	At1g59910	Proteína que contiene un dominio con homología a formina
0,5590	At3g55430	Proteína de la familia 17 de las glicosil hidrosilasas, putativa beta- 1,3- glucanasa
0,5517	At1g78040	Alergeno de polen y proteína de la familia extensina
0,5475	At1g12550	Proteína de la familia de las oxidoreductasas
0,5462	At4g13730	Proteína que contiene un dominio RabGAP/TBC, similitud al activador de GTPasa (GYP1)

* El coeficiente de Spearman correlaciona la expresión de dos genes que se están comparando, en este caso el gen At2g23120 con cada uno de los genes de la primera columna de la tabla. El valor positivo indica una correlación positiva (aumento en la expresión). Valores mayores a 0,2 se consideran como co-respuesta.

Se utilizó la opción de Single Gene Query, que permite poner como entrada un gen (en este caso At2g23120) y buscar valores de co-respuesta con miles de genes de Arabidopsis. Se usó la matriz atge0100, que incluye datos recopilados de 63 experimentos de arreglos de diferentes tejidos y distintas etapas del desarrollo de Arabidopsis silvestre (Col-0). Todos los perfiles derivan del Consorcio AtGenExpress y fueron originados desde microarreglos 22K ATH1 (Affimetrix). Esta elección se basó en la presunción de que el gen At2g23120 podría tener un rol durante todo el ciclo de vida de la planta, debido a los niveles de expresión que presenta en las distintas etapas del desarrollo. La correlación se basó en el coeficiente de Spearman, que mide la magnitud y dirección de la asociación entre dos variables. Este puede tomar valores entre +1 y -1, mientras más cercano a +1 la correlación es fuerte y positiva (es decir los dos genes aumentan su expresión). Valores por sobre 0,2 son considerados como co-respuesta.

La mayoría de los genes que co-responden con At2g23120 son genes involucrados en modificación y biosíntesis de pared celular (glicosil transferasa, hidrolasa, expansina, extensina, glucanasa), lo que podría insinuar un putativo rol directo o indirecto de este gen en estos procesos.

5.7 Análisis del producto proteico del gen At2g23120

La secuencia aminoacídica codificada por el gen At2g23120 es de 83 aminoácidos, la cual fue analizada mediante el servidor PredictProtein (Rost y col., 2004) que utiliza diversos programas para analizar secuencias, estructura y función de proteínas. La secuencia proteica se ingresa al servidor y el resultado incluye el análisis individual de cada uno de los programas analizados.

En resumen, los resultados indican el reconocimiento, mediante ProDom, de un dominio PD014923 que abarca la región entre los aminoácidos 10 al 60, conservado en varias proteínas LEA, el cual no posee función conocida.

La zona que comprende el amino y carboxilo terminal fueron predichas como regiones de muy baja complejidad por el programa SEG, y como zonas con estructuras secundarias no regulares (predicción de NORS). PROF confirma la irregularidad estructural de la secuencia atribuyendo a un 91,6% de la secuencia una estructura de loop y un 8,4% de la proteína a estructura hélice, además el 91,6% de la proteína esta expuesta (por más del 16% de la superficie del aminoácido) al solvente. La estructura de tipo hélice fue predicha en los alrededores del aminoácido 40 (Figura 12), con un nivel de confianza bajo.

1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8...
AA	MEAGKTPPTTTTTEKKTEQVKDNDLPTDSPYMATGTLEDYKLYKAYGAEGHQEPTPLGGGSTDAPTPSGDAPAATTTDAKAP
PROF_sec	HHHHHHH
Rel_sec	9.6775 6.7777766 0.0000000 7.7888888 6.22343 3.1363331 0.155465 5.67785 5.66465 7.7888888 7.554 4.57789
SUB_sec	LLLLL . LLLLLLLL LLLLLLLL H LL . LL . LLLLLLLL . LLLLLLLLLL LLLLL

Figura 12: Resultado del análisis de la estructura proteica codificada por el gen At2g23120 mediante PROF. La fila AA representa la secuencia aminoacídica. PROF_sec señala la estructura secundaria predicha por el programa (H = hélice). Rel_sec es un índice de validación (confiabilidad) de la predicción PROF_sec asociado a cada residuo (0: baja a 9: alta). SUB_sec denota las subclases de la predicción PROF_sec (L = loop, H = hélice y · = residuo sin predicción.). En rojo se destaca la posible hélice y en verde las regiones con loop.

Otro de los programas incluidos en el análisis por PredictProtein es PROSITE, que busca motivos funcionales dentro de la secuencia, el cual encontró un sitio de fosforilación por kinasa C en el aminoácido 14, dos sitios de fosforilación por caseína kinasa II en el residuo 12 y 37 y un sitio de N- miristoilación en el residuo 57. Esta última es una modificación post traduccional que adiciona un grupo miristoil que le

confiere hidrofobicidad a la proteína para ser dirigida a membranas celulares o a interacciones proteína-proteína.

Debido a que la secuencia aminoacídica codificada por el gen At2g23120 parece tener una estructura azarosa, sin la presencia de las típicas estructuras secundarias se utilizó el programa RONN (Yang y col., 2005) que predice regiones nativamente desordenadas dentro de proteínas, para confirmar estas predicciones. De un modo simple, RONN compara la secuencia con una serie de secuencias que poseen un plegamiento conocido, los valores de alineamiento contra estas proteínas son usados para clasificar cada secuencia como ordenada o desordenada.

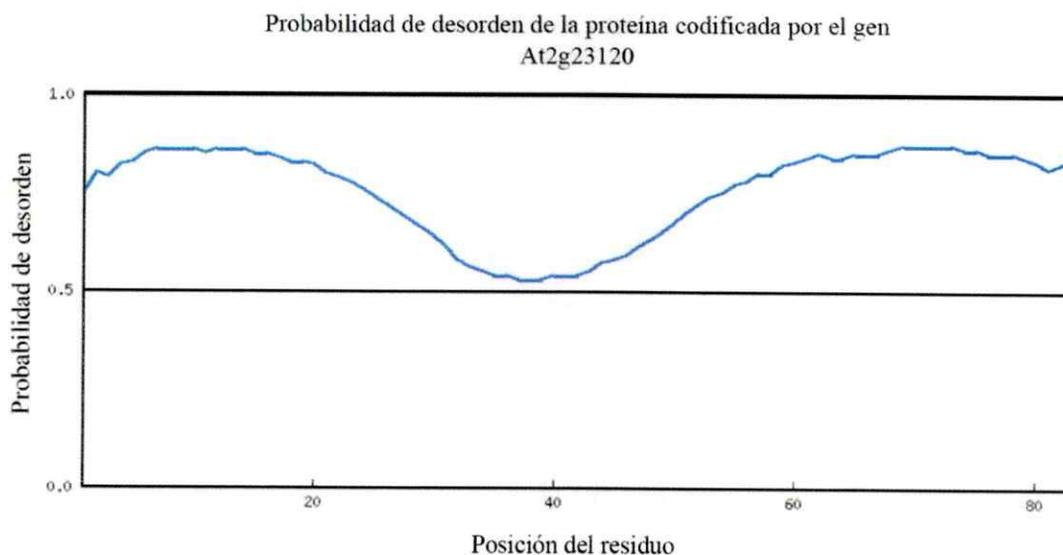


Figura 13: Resultado del análisis de la estructura proteica codificada por el gen At2g23120 mediante RONN. El eje de las abscisas representa la probabilidad de desorden, siendo 1 el valor máximo. El eje de las ordenadas representa la posición del residuo aminoacídico.

Este análisis demuestra que la zona de mayor orden dentro de la secuencia es alrededor del aminoácido 40 (Figura 13), correspondiente a la hélice predicha por PredictProtein.

Dado la alta accesibilidad al solvente que posee la secuencia, es probable que se encuentre en el citoplasma. Los programas PSort y LOCtree predicen una localización de este tipo.

5.8 Inmunolocalización en plantas de Arabidopsis utilizando un anticuerpo para la subunidad Exo70 del complejo exocyst humano.

El complejo exocyst está bien caracterizado en levaduras y mamíferos. La mayoría de las publicaciones en que detectan el complejo, a través de inmunolocalización o inmunoblot, es utilizando un anticuerpo contra un epítopo fusionado a alguna subunidad del complejo y en otros casos existen anticuerpos diseñados contra una región de la proteína que codifica para una subunidad. A través de una búsqueda bibliográfica se encontró un anticuerpo policlonal (Xu y col., 2005) contra un péptido de 14 aminoácidos de la subunidad Exo70 de humano, el cual se encuentra bien conservado en uno (At2g39380) de los 22 ortólogos que posee Arabidopsis para esta subunidad, como se muestra en el alineamiento de la Figura 14A.

Utilizando este anticuerpo para realizar inmunolocalización en plántulas completas de 4 días y mediante microscopía confocal, se detectó una señal en los contornos de las células de los cotiledones (Figura 14B), en la zona basal de las células de la radícula (Figura 14C) y en el contorno de los pelos radiculares especialmente en la punta del pelo y de forma circular en el interior (con un diámetro de 1 μm aproximadamente). Sin

embargo el hipocotilo de estas plántulas no presentaba señal (dato no mostrado). Los controles negativos para este experimento tampoco presentaron señal dado que consistía en plántulas sometidas al mismo protocolo de inmunolocalización, pero sin la incubación con el anticuerpo primario (dato no mostrado).

Tratamientos con BFA no alteraron la localización de esta señal (datos no mostrados), indicando que la localización de la proteína reconocida por el anticuerpo Exo70 es independiente del tráfico vesicular sensible a BFA.

Arabidopsis 551 CKVHSTWVVFDEQLKEELKISLARLLVPAYGSFIGRFQNLGDIGKNADKYIKYGVEDIEA 610
 CK+ W + D + ++ ++ + ++ YG+F+ +F ++ KN +KYIKYGVE +
 A Humano 616 CKIQKAWAIPDTEQRDRIRQAQKTIVKETYGAFLQKFGSV-PE **TKNPE KYIKYGVEQ** VGD 674

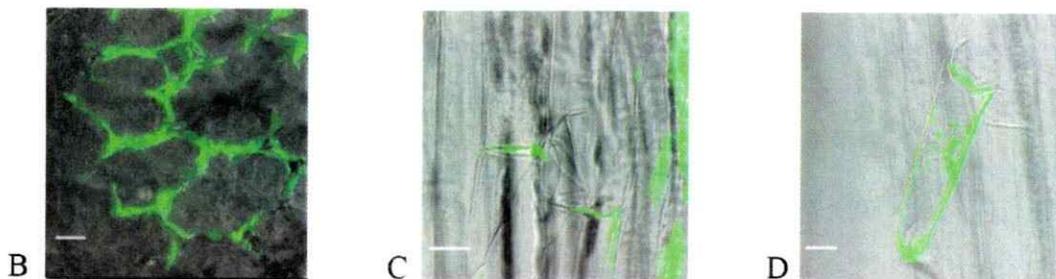


Figura 14: Inmunolocalización utilizando un anticuerpo anti-Exo70 humano en plántulas de Arabidopsis. A. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la subunidad Exo70 humana y un ortólogo de Arabidopsis (At2g39380) para esta misma subunidad, entre ellas se indican los aminoácidos idénticos con la letra correspondiente y con un signo + los aminoácidos similares. La zona marcada con verde muestra el péptido contra el cual se hizo el anticuerpo policlonal. B. Señal del anticuerpo en cotiledones. C. Señal del anticuerpo en raíz. D. Señal del anticuerpo en un pelo radicular. La barra de tamaño (-) equivale a 10 μ m.

6.- DISCUSIÓN

La polaridad celular cumple una función muy importante en el desarrollo de organismos multicelulares complejos (Cove, 2000). La mantención de la polaridad celular requiere de la secreción de vesículas a distintos dominios de la membrana plasmática (Nelson & Yeaman, 2001). En los organismos eucariontes, el mecanismo por medio del cual las vesículas son destinadas polarmente a dominios específicos de la membrana plasmática, previo a la fusión, se encuentra altamente conservado. Este proceso está comandado por el ensamble de un complejo multiproteico denominado exocyst (Hsu y col., 1999). Con el objetivo de estudiar si las plantas mantienen este mecanismo, complementamos mutantes secretorios termosensibles de *S. cerevisiae* con genes vegetales ortólogos de componentes del complejo así como con una genoteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*.

En *Arabidopsis*, previamente habían sido identificados ortólogos, a nivel de secuencia aminoácida, para todas las subunidades del complejo exocyst (Jurgens & Geldner, 2002). Sin embargo, no conocíamos la identidad que compartían con las subunidades de levadura. Por esta razón se repitió la búsqueda de los ortólogos utilizando BLASTp y las secuencias aminoácidas de las subunidades de levadura como molde contra la base de datos de *Arabidopsis*. Se confirmaron ortólogos únicos para las subunidades Sec3, Sec6, Sec8, Sec10; dos ortólogos para Sec5 y Sec15; tres ortólogos para Exo84 y 22 ortólogos para Exo70. El análisis dio como resultado que los porcentajes de identidad entre las secuencias de levadura y *Arabidopsis* son bajos, alrededor del 20% (Tabla 3). Sin embargo, existen ejemplos de genes de *Arabidopsis* que poseen una baja identidad con

su ortólogo en levadura, pero que son capaces de complementar la función en el mutante (Sweetman y col., 2005). Además la identidad entre las subunidades del complejo de levaduras y el de mamíferos también es baja (Kee y col., 1997), alrededor del 20%.

Dada esta evidencia, es posible que los ortólogos de *Arabidopsis* pudieran complementar los mutantes de levadura. Para comprobar esto, clonamos en vectores de expresión de levadura los cDNAs de *Arabidopsis* ortólogos a las subunidades Sec5, Sec6, Sec8 y Sec10 y luego transformamos los respectivos mutantes. Estos constructos no suprimieron el defecto en la yemación de las cepas de *S. cerevisiae* (Figura 3), a pesar de estar expresando las proteínas (Figura 4). Una posible explicación es que proteínas de *Arabidopsis* codificadas por los genes predichos como putativos ortólogos del complejo exocyst no formen parte de un complejo de este tipo en la planta. Otra explicación podría ser que las proteínas de *Arabidopsis* si forman parte del complejo, pero son incapaces de interactuar con el complejo de levaduras o requieren de otros factores para su ensamble que no se encontrarían en este sistema. Esta última explicación cobra validez, al analizar las estructuras de las subunidades del complejo. En levaduras, están compuestas mayoritariamente de módulos helicoidales agrupados en una gran estructura alargada. Al analizar las secuencias aminoacídicas de las putativas subunidades del complejo en *Arabidopsis* encontramos la presencia exclusiva de hélices en sus secuencias. Esto sugiere que las estructuras secundarias no son suficientes para la interacción con las subunidades de levadura, sino que se requeriría de una conformación tridimensional específica. Esto fue comprobado por Dong y col., 2005 al verificar que para la interacción proteína- proteína entre las subunidades, se requiere de toda la estructura tridimensional de la subunidad para la correcta formación del complejo.

También sabemos que los componentes del complejo exocyst poseen características específicas en cada especie, como por ejemplo, la subunidad Sec5 en mamíferos posee un dominio de interacción con RalA, componente de una familia de GTPasas que no existen en levaduras (Sugihara y col., 2002). Esta podría ser la razón por la cual no existe complementación de los mutantes de levadura con los ortólogos de Arabidopsis y podría explicar el porque tampoco existe en la literatura un ejemplo de complementación de los mutantes secretorios de *S. cerevisiae* con las subunidades del complejo exocyst de mamíferos.

Para estudiar si existen otras proteínas de Arabidopsis que pudieran complementar los mutantes secretorios, ya sea reemplazando a la subunidad mutada o suprimiendo la mutación de otra forma, utilizamos una genoteca de cDNA de Arabidopsis para la complementación de las cepas mutantes. Encontramos un mutante de la cepa NY402 (sec5-24) capaz de yemar y secretar invertasa al medio extracelular a la temperatura restrictiva, igual que la cepa silvestre (Figura 7). El cDNA contenido en el vector recuperado desde este mutante correspondía al transcrito completo del gen At2g23120 de Arabidopsis y su expresión en el mutante NY402 suprime el defecto secretorio. Anteriormente se había reportado la capacidad de un cDNA de Arabidopsis para complementar una cepa de levaduras mutante en la subunidad Sec15. Este cDNA codificaba una proteína con un dominio "RING finger", presente en algunas proteínas que interactúan con pequeñas GTPasas (Matsuda & Nakano, 1998), la cual no poseía identidad con la subunidad Sec15 de levadura. Se propuso un mecanismo indirecto por el cual la supresión de la mutación era mediante una interacción con la Rab GTPasa Sec4.

La secuencia del gen At2g23120 codifica una proteína de 83 aminoácidos, hidrofílica, desordenada, sin estructuras secundarias, con tres putativos sitios de fosforilación y uno de miristoilación. No posee identidad alguna con la proteína Sec5 de levadura ni con alguna otra proteína de levadura, pero sí posee una alta identidad con proteínas LEA de otras especies vegetales. Esto era de esperar ya que las proteínas LEA no poseen una contraparte en el proteoma de *S. cerevisiae*. Hasta el momento no se ha descrito alguna función particular para proteínas LEA, pero hay evidencia indirecta de que jugarían un rol como protectores de estructuras celulares y proteínas, especialmente bajo condiciones de estrés como sequedad, salinidad y frío (Hong-Bo y col., 2005).

Como una forma de entender el rol que podría cumplir esta proteína tipo LEA en la supresión de la mutación en la cepa NY402, estudiamos la expresión del gen At2g23120 en *Arabidopsis*. Encontramos que este gen se expresa en los distintos tejidos y durante todo el desarrollo de *Arabidopsis*, alejándose del patrón clásico de expresión de los genes LEA, el cual consiste en una fuerte y exclusiva expresión durante las últimas etapas de la embriogénesis o bajo condiciones de desecación (Bray, 1993). Su expresión parece tener una regulación durante todo el desarrollo de la planta, lo cual se puede deducir al comparar con un gen que mantiene una expresión constitutiva en *Arabidopsis*, como Actina 7. Se han descrito otras proteínas LEA que poseen expresión en tejidos vegetativos durante el desarrollo de la planta (Iwasaki y col., 1995; Rouse y col., 1996). Una de estas proteínas es pvLEA-18 de *Phaseolus vulgaris* (ortólogo de la proteína codificada por el gen At2g23120), cuya acumulación ocurre durante el desarrollo bajo condiciones normales de riego especialmente en órganos o tejidos expuestos a bajos potenciales hídricos como semillas disecadas, polen, cilindros vasculares e hidátodos.

Además esta altamente expresada en plántulas en elongación, raíces y raíces laterales emergentes, sugiriendo que PvLEA-18 otorga protección durante las etapas iniciales de desarrollo o en tejidos que sufren cambios osmóticos constantes o severos. Este gen es transcripcionalmente modulado por ABA en procesos de desarrollo, pero esta hormona no juega un rol importante en la respuesta a deshidratación (Moreno-Fonseca & Covarrubias, 2001). Otra similitud se encuentra entre el transcrito de At2g23120 y PvLEA-18, ya que ambos poseen una región 3' UTR bastante extensa, similar al tamaño del ORF para At2g23120. Como en muchos genes de plantas esta región 3'UTR podría funcionar como un "enhancer" transcripcional (Larkin y col., 1993; Fu y col., 1995) o a un nivel post transcripcional, estabilizando al RNA (Gutierrez y col., 1999). Se ha demostrado que dicha región en PvLEA-18 permite un aumento en la expresión durante el desarrollo y en respuesta a la deshidratación, pero no a la aplicación de ABA exógeno. Es posible que el gen At2g23120 también se encuentre modulado por ABA, ya que al analizar el perfil transcripcional *in silico* de este gen bajo distintos tratamientos, vemos que ABA induce su expresión al igual que el estrés osmótico. La hormona auxina también podría participar en su modulación transcripcional, ya que al aplicar un inhibidor de la biosíntesis de esta hormona, el nivel de transcrito disminuye.

Con estos datos de expresión no logramos tener una idea muy clara de la posible función de este gen en la planta, por esto decidimos realizar un análisis de co-respuesta transcripcional entre At2g23120 y otros 12.200 genes. Se ha demostrado que los análisis de co-respuesta transcripcional son un recurso valioso en el descubrimiento de patrones comunes de regulación génica (Lisso y col., 2005). Al realizar este tipo de análisis con el gen At2g23120, descubrimos que co-expresa con varios genes involucrados en

modificación y biosíntesis de pared celular. El mayor nivel de co-respuesta es junto a un gen que codifica una proteína rica en glicina relacionada a pared celular. Se ha descrito que estas proteínas son estructurales y se acumulan durante el desarrollo de tejido joven y son inducidas por heridas en el tejido adulto (Keller y col., 1989). Otros de los genes co- expresados junto a At2g23120 codifican para: factor de crecimiento independiente de auxina, expansina (proteínas que median la extensión de la pared celular), hidrolasa similar a MLO7 (proteína de membrana, involucrada en defensa), glicosil transferasa, glicoproteína rica en hidroxiprolina (proteína estructural de pared celular), glicosil hidrolasa, extensina y una proteína Rab similar a GYP1 de levadura (activador de GTPasa que participa en el reciclamiento de membrana, Lafourcade y col., 2004). También aparecen co-expresados otros genes que por la clasificación que poseen no se pueden asociar directamente a la biosíntesis de pared celular, pero sí a una respuesta a estrés, entre ellos se encuentran: proteína asociada a senescencia/deshidratación relacionada a ERD7 (gen inducible por sequía, frío y estrés salino), proteína de unión a calcio, proteína con dominio SET (involucrada en modificación de la cromatina), otra proteína LEA similar a LEA14-A (gen inducido en respuesta a heridas y estrés por luz), proteína con un dominio transmembrana similar a una proteína de membrana asociada a ribosoma RAMP4 (proteína involucrada en la estabilización de membranas durante estrés, Yamaguchi y col., 1999), proteína tipo inhibidor de cisteína proteinasa y una proteína de la familia de las oxidoreductasas.

Toda esta evidencia sugiere que el rol de At2g23120 en Arabidopsis podría encontrarse asociado a la modificación y biosíntesis de pared celular durante el desarrollo normal de

la planta y también podría participar (aumentando su acumulación) en respuesta a estrés, ya sea en procesos relacionados con pared celular o tal vez como chaperona.

Para continuar con la búsqueda de la posible función de la proteína codificada por At2g23120 estudiamos su estructura, encontrando que posee una estructura nativa desordenada al igual que la mayoría de las proteínas LEA. En los últimos años este tipo de proteínas han provocado gran interés dado que de un total de 7.849 secuencias proteicas de Arabidopsis aproximadamente el 8% (es decir 650 proteínas) se han predicho como proteínas que carecen de estructura ordenada. Tomando en cuenta las proteínas desordenadas parcialmente (regiones de mas de 50 aminoácidos sin estructura secundaria o terciaria), este número sube al 29% (Dunker y col., 2000). En algunos casos, las proteínas desordenadas adoptan estructuras ordenadas al unirse a su blanco molecular que podría ser otra proteína (Bourhis y col., 2004), una membrana (Davidson y col., 1998), RNA (Tompa & Csermely, 2004) o DNA (Love y col., 2004). Existen ejemplos en que el ordenamiento es condicional, en respuesta a un estímulo externo como cambio de temperatura, pH, concentración de iones (Uversky, 2002) y desecación (Luo & Baldwin, 1997). Por lo tanto el desorden en una proteína no es sinónimo de falta de funcionalidad, sino que rompe con el clásico esquema que asocia estructura con función. Además se cree que las proteínas desordenadas son mucho más flexibles.

Las modificaciones post-traduccionales podrían aportar el cambio conformacional que lleve a la forma activa a una proteína desordenada. En la secuencia de la proteína codificada por At2g23120 se predijeron tres sitios de fosforilación que podrían gatillar la unión a otra proteína y un cambio estructural. También se predijo un sitio de miristoilación en el aminoácido 57. Esta es una modificación post transcripcional

irreversible que consiste en la adición covalente de un grupo miristato (ácido graso saturado de 14 carbonos) a un residuo de glicina N-terminal, el cual podría ser un residuo interno y que queda expuesto luego de un clivaje. La miristoilación provoca estabilidad conformacional de proteínas, también permite interacción con membranas (McLaughlin & Aderem, 1995) o dominios hidrofóbicos de otras proteínas. En plantas la miristoilación ha sido demostrada en algunas proteínas, involucradas en regulación de crecimiento, resistencia a enfermedades, tolerancia a sal y endocitosis (Grebe y col., 2003; Ishitani y col., 2000; Martin & Busconi, 2000). Sin embargo, esta predicción no parece muy confiable ya que no se muestra ningún sitio de clivaje en la proteína codificada por At2g23120 y el residuo de glicina denotado como el posible receptor de esta modificación se encuentra más cerca del carboxilo terminal de la proteína, por lo tanto si sufriera algún clivaje quedaría una porción de 20 aminoácidos cumpliendo la función de interactuar con alguna membrana o proteína.

Al no conocer que función cumple el producto proteico de At2g23120 en Arabidopsis se hace difícil especular de su posible rol durante la complementación del mutante NY402. Sabemos que este mutante posee una mutación puntual que provoca una proteína mal plegada a 37° C. Asumiendo que esta proteína posee un rol de tipo chaperona, como muchas LEAs, podemos inferir que estaría actuando en el correcto plegamiento de la subunidad Sec5 en el mutante o en la estabilización del complejo ante la ausencia de uno de sus componentes. Pensando que la temperatura restrictiva sea un estrés para la levadura mutante, esta proteína LEA podría cumplir un rol de este tipo. Por mecanismos aún no conocidos la sobreexpresión de la proteína Le25 (proteína LEA) de tomate en levaduras provoca un aumento del crecimiento bajo condiciones de deshidratación (Imai

et al., 1996). Otros efectos de tolerancia a estrés se han observado al expresar proteínas LEA de trigo y cebada en levaduras (Zhang y col., 2000).

Podríamos suponer que al ser una chaperona, esta proteína tipo LEA debería complementar a todos los mutantes secretorios de levadura, ayudando a su correcto plegamiento. Sin embargo sólo complementa al mutante en Sec5 de levaduras (datos no mostrados). La subunidad Sec5 parece interactuar con el resto de los componentes que se unen a la vesícula secretoria de manera tardía (Murthy y col., 2003), casi al llegar a la membrana plasmática. Quizás la proteína LEA estabilice al complejo que ya está casi correctamente formado o que esta compartimentalización de Sec5 cerca de la membrana coincida con la ubicación de esta proteína tipo LEA, lo que le permita ejercer su acción sobre Sec5.

Basándonos solamente en estos análisis *in silico* es difícil encontrar la respuesta al como una proteína desordenada, que posiblemente participa en procesos relacionados con modificación y biosíntesis de pared celular, es capaz de suprimir la mutación en Sec5 de una cepa de *S. cerevisiae*, pero queda abierta la pregunta para continuar investigando y entender la real función de esta proteína en la planta.

Una alternativa a la búsqueda de ortólogos vegetales del complejo exocyst fue utilizar un anticuerpo heterólogo para realizar inmunolocalización en plántulas de Arabidopsis. En este caso se usó un anticuerpo contra la subunidad Exo70 en mamíferos (Xu y col., 2005), encontrando que este reconoce un epítopo asociado a los bordes celulares en plántulas de cuatro días. La señal era alrededor de todo el contorno en cotiledones y pelos radiculares, y se localizó basalmente en células de la radícula (Figura 14B, C y D). El anticuerpo no reconoce ningún epítopo en el hipocotilo. Si la función del putativo

complejo exocyst vegetal fuera dirigir la exocitosis polarizada, como en el resto de los eucariontes, el reconocimiento de un epítope basal se convierte en un resultado interesante. Más aún, porque la subunidad Exo70 se ha descrito como el posible marcador de membrana en la exocitosis polarizada. Sin embargo todavía no sabemos que está reconociendo el anticuerpo, por lo que es necesario realizar experimentos que permitan resolver este problema, como por ejemplo inmunoprecipitar y secuenciar el péptido.

7.-CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

- Los cuatro cDNAs de Arabidopsis que codificarían para putativos ortólogos de las subunidades Sec5, Sec6, Sec8 y Sec10 del complejo exocyst no poseen la capacidad de complementar mutantes secretorios de levadura. Esto podría deberse a que las proteínas codificadas por estos cDNAs son incapaces de reemplazar a un componente del complejo en levadura debido a que su estructura tridimensional es incompatible o podrían necesitar de otras proteínas para el ensamble del complejo. Otra explicación sería que estos cDNAs de Arabidopsis no forman parte de un posible complejo exocyst vegetal, debido a que Arabidopsis podría tener otros mecanismos para dirigir la exocitosis polarizada y por lo tanto no lo requeriría.
- El cDNA completo del gen At2g23120 de Arabidopsis reestablece la yemación y la secreción en el mutante NY402 (sec5-24) de *S. cerevisiae*, por un mecanismo aún no descubierto. Este gen no posee una función conocida y se expresa en Arabidopsis en todos los tejidos y estados de desarrollo analizados.

El estudio de un mutante insercional en el gen At2g23120 serviría para encontrar la función que posee este gen en la planta. La búsqueda de

fenotipos podría enfocarse a procesos que involucren alta secreción polarizada como elongación del tubo polínico o de pelos radiculares.

- El gen At2g23120 codifica una proteína similar a las codificadas por genes LEA: es hidrofílica, no posee estructuras secundarias típicas, tiende nativamente al desorden y probablemente se localiza en el citoplasma.

Una forma de confirmar la localización subcelular predicha *in silico*, sería transformar plantas de manera transiente o estable con una fusión de la proteína con un epítopo detectable mediante anticuerpos.

- Es posible que la proteína codificada por el gen At2g23120 no reemplace la función de la proteína Sec5 de levaduras, debido a grandes diferencias en secuencia y tamaño.
- Un anticuerpo policlonal anti-Exo70 humano, reconoce un epítopo en los contornos celulares de cotiledones y radícula de plántulas de cuatro días de *Arabidopsis*, con localización basal en este último órgano.

Es necesario determinar si la proteína reconocida por el anticuerpo corresponde a uno de los ortólogos de Exo70 en *Arabidopsis*. Esto podría realizarse mediante inmunoprecipitación y posterior secuenciación del péptido.

8.-BIBLIOGRAFÍA

Adamo J.E., Rossi G., and Brennwald P. 1999. The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol. Biol. Cell* **10**: 4121-4133.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Batoko H., Zheng H.Q., Hawes C. and Moore I. 2000. A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* **12**: 2201-2218.

Bednarek S.Y. and Falbel T.G. 2002. Membrane trafficking during plant cytokinesis. *Traffic* **3**: 621-629.

Bonnet D.G. and Wright T.A. 2000. Sample requirements for estimating Pearson, Kendall and Spearman correlations. *Psychometrika* **65**: 23-28.

Bourhis J.M., Johansson K., Receveur-Brechot V., Oldfield C.J., Dunker K.A., Canard B. and Longhi S. 2004 The C-terminal domain of measles virus nucleoprotein belongs to the class of intrinsically disordered proteins that fold upon binding to their physiological partner. *Virus Res.* **99**: 157-167.

Boyd C., Hughes T., Pypaert M. and Novick P. 2004. Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J. Cell Biol.* **167**: 889-901.

- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R. and Gorlach J.** 2001. Growth stage- based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499-1510.
- Bray E.A.** 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* **103**: 1035-1040.
- Cheung A.Y., Chen C., Glaven R., Vidali L., Hepler P.K. and Wu H.M.** 2002. Rab2 regulate vesicular transport between endoplasmic reticulum and Golgi bodies and is important for pollen tube elongation. *Plant Cell* **14**: 945-962.
- Cole R.A., Synek L., Zarsky V. and Fowler J.E.** 2005. Sec8, a subunit of the putative Arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiology* **138**: 1637-1643.
- Cove D.J.** 2000. The generation and modification of cell polarity. *Journal of Experimental Botany* **51**: 831-838.
- Davidson S.W., Jonas A., Clayton D.F. and George J.M.** 1998. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **273**: 9443-9449.
- Dohmen R.J., Strasser A. W., Honer C.B. and Hollenberg C.P.** 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**: 691-692.
- Dong G., Hutagalung A.H., Fu C., Novick P. and Reinisch K.M.** 2005. The structures of exocyst subunits Exo70p and Exo84p C-terminal domains reveal a common motif. *Nature Structural and Molecular Biology* **12**: 1094-1100.
- Drubin D.G and Nelson W.J.** 1996. Origins of cell polarity. *Cell* **84**: 335-344.

- Dunker A.K., Obradovic Z., Romero P., Garner E.C. and Brown C.J.** 2000. Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* **11**: 161-171.
- Finger F.P. and Novick P.** 1998. Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *The Journal of Cell Biology* **142**: 609-612.
- Friml J., Benková E., Mayer U., Palme K. and Muster G.** 2003 Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *The Plant Journal* **34**: 115-124.
- Fu H., Kim S.Y. and Park W.D.** 1995. High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 50 and 30 flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* **7**: 1387-1394.
- Gietz R.D. and Schiestl R.H.** 1991. Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* **7**: 253-263.
- Grebe M., Xu J., Mobius W., Ueda T., Nakano A., Geuze H.J., Rook M.B. and Scheres B.** 2003. Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* **13**: 1378-1387.
- Guo W., Tamanoi F. and Novick P.** 2001. Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* **3**: 353-360.
- Gutiérrez R.A., Macintoch G.C. and Green P.J.** 1999. Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci.* **4**: 429-438.

- Hong-Bo S., Zong-Suo L. and Ming-An S.** 2005. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surface B. Biointerfaces* **45**: 131-135.
- Hsu S.C., Ting A.E., Hazuka C.D., Davanger S., Kenny J.W., Kee Y. and Scheller R.H.** 1996. The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* **17**: 1209-1219.
- Hsu S.C., Hazuka C.D., Roth R., Foletti D.L., Heuser J. and Scheller R.H.** 1998. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* **20**: 1111-1122.
- Hsu S.C., Hazuka C.D., Foletti D.L. and Scheller R.H.** 1999. Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends in Cell Biology* **9**: 150-153.
- Imai R., Chang L., Ohta A., Bray E.A. and Takagi M.** 1996. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**: 243-248.
- Inoue H., Nojima H. and Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene* **96**: 23-28.
- Ishitani M., Liu J., Halfter U., Kim C.S., Shi W. and Zhu J.K.** 2000. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**: 1667-1677.
- Iwasaki T., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.** 1995. Identification of a *cis* regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 391-398.

Jurgens G. and Geldner N. 2002. Protein secretion in plants: from the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic* **3**: 605-613.

Kee Y., Yoo J.S., Hazuka C.D., Peterson K.E., Hsu S.C. and Scheller R.H. 1997. Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14438-14443.

Keller B., Templeton M.D. and Lamb C.J. 1989. Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1529-1533.

Lafourcade C., Galan J.M., Gloor Y., Haguenaer-Tsapis R. and Peter M. 2004. The GTPase-activating enzyme Gyp1p is required for recycling of internalized membrane material by inactivation of the Rab/Ypt GTPase Ypt1p. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 3815-3826.

Larkin J.C., Oppenheimer D.G., Pollock S. and Marks M.D. 1993. *Arabidopsis* *GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell* **5**: 1739-1748.

Lisso J., Steinhauser D., Altmann T., Kopka J. and Mussig C. 2005. Identification of brassinosteroid-related genes by means of transcript co-response analyses. *Nucleic Acids Research* **33**: 2685-2696.

Love J.J., Li X., Chung J., Dyson H.J. and Wright P.E. 2004. The LEF-1 high-mobility group domain undergoes a disorder-to-order transition upon formation of a complex with cognate DNA. *Biochemistry* **43**: 8725-8734.

- Luo P. and Baldwin R.L.** 1997. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* **36**: 8413-8421.
- Martin M.L. and Busconi L.** 2000. Membrane localization of a rice calciumdependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J.* **24**: 429-435.
- Matsuda N. and Nakano A.** 1998. RMA1, an *Arabidopsis thaliana* gene whose cDNA suppresses the yeast Sec15 mutation, encodes a novel protein with a RING finger motif and a membrane anchor. *Plant Cell Physiology* **39**: 545-554.
- McLaughlin S. and Aderem A.** 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 272-276.
- Moreno-Fonseca L.P. and Covarrubias A.A.** 2001. Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Molecular Biology* **45**: 501-515.
- Mott H.R., Nietlispach D., Hopkins L.J., Mirey G., Camonis J.H. and Owen D.** 2003. Structure of the GTPase-binding domain of Sec5 and elucidation of its Ral binding site. *J. Biol. Chem.* **278**: 17053-17059.
- Murashige T. and Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 437-497.
- Murthy M., Garza D., Scheller R.H. and Schwarz T.L.** 2003. Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persist. *Neuron*: **37**: 433-447.

- Nelson W.J. and Yeaman C.** 2001. Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol.* **11**: 483-486.
- Novick P., Field C. and Schekman R.** 1980. Identification of 23 complementation groups required for post- translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-215.
- Otegui M.S. and Staehelin L.A.** 2004. Electron tomographic analysis of post-meiotic cytokinesis during pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 501-515.
- Rost B., Yachdav G. and Liu J.** 2004. The predict protein server. *Nucleic Acids Research* **32**: 321- 326.
- Rouse D.T., Marotta R. and Parish R.W.** 1996. Promoter and expression of an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. *FEBS Lett.* **381**: 252-256.
- Seguí-Simarro J.M., Austin II J.R., White E.A. and Staehelin L.A.** 2004. Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *The Plant Cell* **16**: 836-856.
- Souter M. and Lindsey K.** 2000. Polarity and signalling in plant embryogenesis. *Journal of experimental Botany* **51**: 971-983.
- Steinhauser D., Usadel B., Luedemann A., Thimm O. and Kopka J.** 2004. CSB.DB: a comprehensive systems-biology database. *Bioinformatics* **20**: 3647-3651.
- Sugihara K., Asano S., Tanaka K., Iwamatsu A., Okawa K. and Ohta Y.** 2002. The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nature Cell Biology* **4**: 73-78.

- Sweetman D., Johnson S., Caddick S.E.K., Hanke D.E. and Brearley C.A.** 2005. Characterization of an Arabidopsis inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase (AtIPK1). *Biochem J.* **394**: 95-103.
- Tompa P. and Csermely P.** 2004. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* **18**: 1169-1175.
- Uversky V.N.** 2002. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci* **11**: 739-756.
- Wen T., Hochholdinger F., Saber M., Bruce W. and Schnable P.S.** 2005. The *roothairless1* gene of maize encodes a homolog of Sec3, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiology* **138**: 1637-1643.
- Xu K.F., Shen X., Li H., Pacheco- Rodriguez G., Moss J. and Vaughan M.** 2005. Interaction of BIG2, a brefeldin A- inhibited guanine nucleotide- exchange protein, with exocyst protein Exo70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 2784-2789.
- Yamaguchi A., Hori O., Stern D.M., Hartmann E., Ogawa S. and Tohyama M.** 1999. Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J.Cell Biol.* **147**: 1195-1204.
- Yang Z.R., Thomson R., McNeil P. and Esnouf R.M.** 2005. RONN: the bio- basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* **21**: 3369-3376.
- Zhang L., Ohta A., Takagi M. and Imai R.** 2000. Expression of plant group 2 and group 3 LEA genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J. Biochem.* **127**: 611-616.

Zhang X., Bi E., Novick P., Du L., Kozminski K.G., Lipschutz J.H. and Guo W. 2001. Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J. Biol. Chem.* **276**: 46745-46750.

Zhang X.M., Ellis S., Sriratana A., Mitchell C.A. and Rowe T. 2004. Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 43027-43034.

Zimmermann P., Hirsch- Hoffmann M., Hennig L. and Wilhelm G. 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**: 2621-2632.