

UCH-FC  
MA6-B  
R 896  
C.1



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**“Evaluación de la función de los genes *AtDFG10s* en *Arabidopsis thaliana* y su importancia en el efecto fisiológico y celular de Sortin2”**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas**

**Por**

**Carlos Felipe Rubilar Hernández**

**Directora de Tesis: Dra. Lorena Norambuena M.**

**Septiembre, 2013**

**Santiago - Chile**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster  
presentada por el candidato,

**Carlos Felipe Rubilar Hernández**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al  
grado de Magister en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis  
rendido el día: Jueves 06 de Junio de 2013.

Directora de Tesis:  
Dra. Lorena Norambuena M.

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Marcelo Baeza

Dr. Marco Tulio Núñez

---

---

---

Mamá, papá: he aquí otro de los frutos de su esfuerzo.  
Espero prontamente el tuyo, Higo.



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer profundamente a mis papás Viviana y Juan Carlos y mi hermano Rodrigo quienes me han apoyado de muchas formas distintas a lo largo de todo este proceso. Gracias por los abrazos, desayunos hechos con cariño y consejos que me han hecho una mejor persona. También agradezco a las personas con las que he compartido en este proceso, a las personas en quienes confío y me río con ellos, personas que estimo mucho y son muy importantes para mí. A los amigos de la vida, a los de la universidad que ya se han transformado de la vida y a las que he hecho a lo largo de estos últimos años. Gracias por haberse cruzado en mi vida, darme diferentes perspectivas de lo que es este pequeño, pero a la vez inmenso mundo. También quisiera agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal por apoyarme en todo este largo camino cristalizado en este escrito. Gracias por sus comentarios y sabios consejos. Y en especial quisiera agradecer al equipo en pleno de la Dra. Lorena Norambuena por todo el apoyo técnico, profesional y personal que me han brindado en todos estos años. Creo sinceramente que sin ustedes yo no hubiera sido capaz de realizar esta tesis. Gracias por cada una de las instancias de camaradería en las que pude disfrutar tanto académicamente como a nivel personal. Quiero decirles que son un grupo humano excepcional y espero que la esencia de ello perdure mucho, pero mucho tiempo más. No hay palabras para agradecer la fortuna que siento por ser parte del grupo LNM. Por último, esencial fue el financiamiento ligado a los proyectos ICMP06-065-F, FONDECYT 11080240 y FONDECYT 1120289. Sin todo este apoyo, esta tesis nunca habría podido siquiera comenzar.

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>Autobiografía</b>	iii
<b>Agradecimientos.</b>	iv
<b>Índice de materias.</b>	v
<b>Listado de Figuras.</b>	viii
<b>Listado de Tablas.</b>	x
<b>Listado de símbolos, abreviaturas y nomenclaturas.</b>	xi
<b>Resumen.</b>	xiii
<b>Abstract.</b>	xv
<b>1.- Introducción.</b>	01
1.1.- El Sistema de endomembranas vegetal: rutas de tráfico y organelos participantes.	01
1.2.- Sistema de endomembranas y su importancia en procesos celulares vegetales.	05
1.3.- Genómica química: Sortin2, un compuesto químico que altera el Sistema de endomembranas.	07
1.4.- <i>ScDFG10</i> participa en la acción celular de Sortin2 y en la N-glicosilación de proteínas.	10
<b>2.- Hipótesis y objetivos.</b>	13
2.1.- Hipótesis.	13
2.2.- Objetivo general.	13
2.3.- Objetivos específicos.	13
<b>3.- Materiales y métodos.</b>	14
3.1.- Material biológico.	14
3.1.1.- Cultivo de bacterias.	14
3.1.2.- Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	17
3.1.3.- Obtención y transformación de células quimio-competentes.	17
3.1.4.- Esterilización y estratificación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	20
3.1.5.- Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	20
3.1.6.- Tratamientos utilizando compuestos químicos en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	21
3.1.7.- Obtención de la línea <i>atdfg10-1-1/atdfg10-2-1</i> .	22
3.1.8.- Transformación estable en <i>Arabidopsis thaliana</i> y selección de plantas transformadas.	23
3.2.- Análisis de DNA y RNA.	24
3.2.1.- Extracción de DNA genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	24
3.2.2.- Protocolo de reacción de PCR y genotipificación del material	27

biológico.	
3.2.3.- Extracción de RNA desde <i>Arabidopsis thaliana</i> y síntesis de cDNA.	28
3.2.4.- Semicuantificación de los niveles de transcritos de <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> .	29
3.2.5.- Amplificación fidedigna de los marcos de lectura abiertos de <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> y su purificación.	30
3.2.6.- Subclonación de los marcos de lectura abiertos de <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> . Purificación, recombinación y confirmación de la clonación.	30
3.3.- Análisis de proteínas.	31
3.3.1.- Detección de la proteína CPY madura y isoformas en los extractos proteicos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	31
3.3.2.- Detección de la proteína CPY en el medio extracelular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	34
3.3.3.- Localización subcelular de los productos de los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	35
3.4.- Obtención y análisis de datos.	36
3.4.1.- Microscopía confocal.	37
<b>4.- Resultados</b>	38
4.1.- Estudio de la función molecular de los genes <i>AtDFG10s</i> .	38
4.1.1.- Amplificación de los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> , subclonación en vectores de clonación y control de calidad de los vectores generados.	38
4.1.2.- Obtención de las cepas <i>dfg10Δ</i> transformadas con los vectores de expresión en levaduras que poseen subclonado <i>AtDFG10-1c</i> y <i>AtDFG10-2c</i> .	46
4.1.3.- Estudios de complementación funcional de los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> en la cepa mutante <i>dfg10Δ</i> .	52
4.2.- Estudio de la función de <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	59
4.2.1.- Obtención de líneas homocigotas de mutantes insercionales de T-DNA que interrumpen a los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> .	59
4.2.2.- Caracterización fenotípica de las líneas mutantes homocigotas.	64
4.2.3.- Estudio de la resistencia al efecto de Sortin2 en las líneas mutantes que poseen interrumpido los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> .	66
4.2.4.- Estudio del efecto de Tunicamicina en las líneas mutantes que poseen interrumpido los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> .	75
4.3.- Corroboración de la función de los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	80
4.3.1.- Obtención de las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas con vectores de expresión en plantas que poseen subclonado <i>AtDFG10-1c</i> y <i>AtDFG10-2c</i> .	80
4.3.2.- Obtención de las líneas mutantes insercionales complementadas con los marcos de lectura abiertos de los genes <i>AtDFG10-1</i> y	86

<i>AtDFG10-2</i> .	
4.3.3.- Evaluación del fenotipo de raíces laterales en las líneas <i>atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1</i> y <i>atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2</i> .	92
<b>5.- Discusión</b>	94
5.1.- La función de <i>AtDFG10s</i> y su efecto en la N-glicosilación de proteínas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	94
5.2.- Implicancias de la función de <i>AtDFG10s</i> en la ruta endocítica y la formación de raíces laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	102
5.3.- Impacto de la función de <i>AtDFG10s</i> en la fisiología de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	108
<b>6.- Conclusiones</b>	110
<b>7.- Bibliografía</b>	111

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Rutas secretoria y endocítica clásicas del Sistema de endomembranas.	05
<b>Figura 2</b> - Amplificación y corroboración de la identidad de los marcos de lectura abierto de los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> .	40
<b>Figura 3</b> - Vectores de clonación y de expresión utilizados y la estrategia de la corroboración de la presencia y dirección del marco de lectura abierto subclonado en ellos.	42-43
<b>Figura 4</b> - Corroboración de la clonación de los marcos de lectura abierta de <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> en el vector de clonación pCR8®.	43
<b>Figura 5</b> - Corroboración de la subclonación de <i>AtDFG10-1c</i> en los vectores de expresión en levaduras.	48
<b>Figura 6</b> - Corroboración de la subclonación de <i>AtDFG10-2c</i> en los vectores de expresión en levaduras.	49
<b>Figura 7</b> - Corroboración de la transformación de la cepa de <i>Sacharomyces cerevisiae dfg10Δ</i> con los vectores p426GPD-eGFP y p426GPD-HA que poseen subclonados a <i>AtDFG10-1c</i> y <i>AtDFG10-2c</i> .	51
<b>Figura 8</b> - Ensayo de glicosilación de proteínas: patrón de glicosilación de CPY.	55
<b>Figura 9</b> - Localización subcelular de <i>AtDFG10-1-GFP</i> en la cepa <i>dfg10Δ</i> .	57
<b>Figura 10</b> - Localización subcelular de <i>AtDFG10-2-GFP</i> en la cepa <i>dfg10Δ</i> .	58
<b>Figura 11</b> - Líneas mutantes <i>atdfg10-1-1</i> y <i>atdfg10-2-1</i> y estrategia de la obtención de la línea doble mutante <i>atdfg10-1-1/atdfg10-2-1</i> .	62
<b>Figura 12</b> - Identificación de las plantas mutantes <i>atdfg10-1-1/atdfg10-2-1</i> .	63
<b>Figura 13</b> - Fenotipo radicular de plantas mutantes en los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> .	66
<b>Figura 14</b> - Evaluación del efecto fisiológico de Sortin2 en las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	68
<b>Figura 15</b> - Efecto de Sortin2 sobre la respuesta gravitrópica de raíces de plantas mutantes en los genes <i>AtDFG10s</i> .	71
<b>Figura 16</b> - Efecto de Sortin2 en la inducción de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes en los genes <i>AtDFG10s</i> .	72
<b>Figura 17</b> - Efecto de Sortin2 en el tráfico endocítico en raíces de plantas silvestres y las líneas <i>atdfg10-1-1</i> y <i>atdfg10-2-1</i> .	74
<b>Figura 18</b> - Efecto de Tunicamicina en el desarrollo foliar de plantas	78-79



silvestres y mutantes en los genes <i>AtDFG10s</i> .	
<b>Figura 19</b> – Efecto de Tunicamicina en el crecimiento vegetativo de plantas silvestres y mutantes en los genes <i>AtDFG10s</i> .	79
<b>Figura 20</b> – Corroboración de la subclonación de <i>AtDFG10-1c</i> en los vectores de expresión en plantas, pGWB5 y pGWB8.	83
<b>Figura 21</b> – Corroboración de la subclonación de <i>AtDFG10-2c</i> en los vectores de expresión en plantas, pGWB5 y pGWB8.	84
<b>Figura 22</b> – Corroboración de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con los vectores de expresión en plantas que poseen subclonados a <i>AtDFG10-1c</i> y a <i>AtDFG10-2c</i> .	86
<b>Figura 23</b> – Estrategia de la obtención de líneas mutantes <i>atdfg10-1-1</i> y <i>atdfg10-2-1</i> transformadas con 35S:: <i>AtDFG10-1c</i> y 35S:: <i>AtDFG10-2c</i> .	89
<b>Figura 24</b> – Corroboración de la integración del fragmento que restituye el marco de lectura de los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> en las líneas <i>atdfg10-1-1</i> y <i>atdfg10-2-1</i> .	90
<b>Figura 25</b> – Evaluación del rescate del fenotipo de inducción de raíces laterales en las plantas <i>atdfg10-1-1/35S::<i>AtDFG10-1c</i></i> y <i>atdfg10-2-1/35S::<i>AtDFG10-2c</i></i> .	93

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1 - Material biológico utilizado.</b>	15
Tabla 1.a.	15
Tabla 1.b.	15
Tabla 1.c.	16
Tabla 1.d.	16
<b>Tabla 2 - Partidores utilizados en las reacciones de PCR realizadas.</b>	26
Tabla 2.a.	26
Tabla 2.b	26
<b>Tabla 3 - Vectores utilizados.</b>	33
<b>Tabla 4 - Tamaños esperados de la amplificación de los marcos de lectura abiertos de <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i> y sus patrones de digestión.</b>	40
<b>Tabla 5 - Patrones de digestión esperados de los vectores pCR8-<i>AtDFG10-1c</i> y pCR8-<i>AtDFG10-2c</i>.</b>	44
<b>Tabla 6 – Verificación de la fidelidad de <i>AtDFG10-1c</i> y <i>AtDFG10-2c</i> subclonados en los vectores de clonación pCR8.</b>	45
<b>Tabla 7 – Patrones de digestión esperados de los vectores de expresión en levaduras que poseen subclonado el marco de lectura abierto de <i>AtDFG10-1</i>.</b>	48
<b>Tabla 8 – Patrones de digestión esperados de los vectores de expresión en levaduras que poseen subclonado el marco de lectura abierto de <i>AtDFG10-2</i>.</b>	49
<b>Tabla 9 – Ensayo de sensibilidad al efecto de Sortin2 en la secreción de la proteína vacuolar CPY.</b>	54
<b>Tabla 10 – Segregación de las dos inserciones de T-DNA que interrumpen los genes <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i>.</b>	64
<b>Tabla 11 – Patrones de digestión esperados de los vectores pGWB5 y pGWB8 que poseen subclonado <i>AtDFG10-1c</i>.</b>	83
<b>Tabla 12 - Patrones de digestión esperados de los vectores pGWB5 y pGWB8 que poseen subclonado <i>AtDFG10-2c</i>.</b>	84
<b>Tabla 13 - Segregación de la resistencia al antibiótico Higromicina en las líneas mutantes transformantes.</b>	91-92

## LISTADO DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

$\Delta$	Delección del gen.
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius.
$\Omega$	Ohm.
$\frac{\Omega}{g}$	Vector de gravedad.
%p/v; %v/v	Porcentaje de peso/volumen; porcentaje de volumen/volumen
<b>35S</b>	Promotor del ARNr 35S del virus del mosaico de la coliflor
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>At</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i> .
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.
<b>C<sup>+</sup>; C<sup>-</sup></b>	Control positivo; control negativo.
<b>Col-0</b>	Ecotipo Columbia-0
<b>CPY</b>	Carboxipeptidasa Y.
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
<b>DNA; cDNA;</b>	Ácido desoxirribonucleico; DNA complementario; Ácido
<b>RNA</b>	ribonucleico.
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato.
<b>DFG</b>	Crecimiento filamentosamente defectuoso.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>D.O.</b>	Densidad óptica.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>F1, F2, F3</b>	Primera generación filial; segunda generación filial; tercera generación filial.
$\mu\text{F}$	Microfaraday
<b>FM4-64</b>	Bromuro de N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-(dietilamino)fenil)hexatrienil)piridinio.
<b>eGFP</b>	Proteína fluorescente verde.
<b>g</b>	Magnitud de la fuerza de gravedad.
<b>GPD</b>	Promotor de la Glicerol fosfato deshidrogenasa.
<b>GTP</b>	Guanilntrifosfato
<b>mg; <math>\mu\text{g}</math>; ng</b>	Miligramos; microgramos; nanogramos.
<b>HA</b>	Hematoaglutinina.
<b>IRGA</b>	Índice de respuesta gravitrópica aberrante
<b>mL; <math>\mu\text{L}</math></b>	Mililitros; microlitros.
<b>cm; mm</b>	Centímetros; milímetros
<b>M; mM; <math>\mu\text{M}</math></b>	Molar; Milimolar; micromolar.
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio.
<b>MLA, c</b>	Marco de lectura abierto.
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio.

<b>NBT</b>	Cloruro de nitroblue tetrazolium.
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
<b>pb; Kb</b>	Pares de bases; Kilobases.
<b>PCR, RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, PCR con transcripción reversa.
<b>pH</b>	Potencial de iones de hidrógeno.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
<b>ms</b>	Milisegundos.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio.
<b>SNAREs</b>	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor</i>
<b>SRD5A3</b>	5 $\alpha$ -esteroide reductasa 3.
<b>T-DNA</b>	DNA de transferencia.
<b>T1, T2, T3</b>	Primera generación filial transformante, segunda generación filial transformante, tercera generación filial transformante.
<b>TM</b>	Tunicamicina.
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano.
<b>U</b>	Unidad enzimática.
<b>UPR</b>	Respuesta a proteína malplegada.
<b>V, KV</b>	Volt, Kilovolts.
<b>wt</b>	Plantas silvestres; cepa de levadura silvestre.

## RESUMEN



El Sistema de endomembranas regula la correcta localización subcelular de macromoléculas mediante el tráfico de vesículas entre los diferentes organelos. Por genómica química, se ha determinado que la función de *ScDFG10* de *Saccharomyces cerevisiae* se requiere para la acción de Sortin2, un compuesto químico que altera el Sistema de endomembranas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*. Sorprendentemente en levaduras, la función de *ScDFG10* ha sido ligada también a la biosíntesis de dolicol, un lípido esencial en la N-glicosilación de proteínas.

En este trabajo se estudió la función de los genes *AtDFG10s* en *Arabidopsis thaliana*, los cuales son ortólogos a *ScDFG10*. La función celular de los productos proteicos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se analizó mediante la complementación de la función de *ScDFG10* en la levadura mutante *dfg10Δ*. Se mostró que *AtDFG10-2* complementa la función de *ScDFG10*, por lo que se podría esperar que cumpla la misma función en *Arabidopsis* tomando en cuenta la conservación entre levaduras y plantas. Sin embargo, en este sistema heterólogo, *AtDFG10-1* no cumple la función de *ScDFG10*, probablemente porque su localización subcelular corresponde inesperadamente al lumen de la vacuola.

El análisis de la función de *AtDFG10s* en *Arabidopsis* se estudió observando el efecto que causa su pérdida de función. Para ello se utilizó mutantes insercionales de T-DNA homocigotas con pérdida de función parcial de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, además de la doble mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*, aislada en este trabajo. La pérdida de

función de *AtDFG10s* provocó una inducción en la formación de raíces laterales. Esta inducción se revirtió por la restitución de los genes interrumpidos en las mutantes simples, lo que indica que efectivamente la función de estos genes está vinculada a la formación de raíces laterales en *Arabidopsis*.

Además, la pérdida de función de *AtDFG10s* otorgó una mayor resistencia a la alteración de la respuesta gravitropica radicular dependiente de Sortin2. Es más, se observó que la pérdida de función de *AtDFG10s* fenocopió el efecto de Sortin2 relativo a la inducción de la formación de raíces laterales. Esto, en conjunto con una menor sensibilidad tanto a esta inducción como a la aceleración del tráfico endocítico, los cuales son efectos dependientes de Sortin2. Estos resultados sugieren que la función de *AtDFG10s* es importante en la acción de Sortin2 en *Arabidopsis* y que su función es requerida en la inducción del tráfico endocítico vinculada al desarrollo de raíces laterales.

Interesantemente, la pérdida de función de *AtDFG10s* también otorga una menor sensibilidad a Tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación de proteínas y consecuentemente un inductor de la respuesta a proteína malplegada. Esto es un indicio de que la función de *AtDFG10s* está implicada en la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis*.

En conjunto, estos resultados sugieren un vínculo funcional entre la N-glicosilación de proteínas y la regulación del tráfico endocítico en *Arabidopsis thaliana*, el cual incide en la formación de las raíces laterales en este organismo vegetal.

## ABSTRACT

The Endomembrane System regulates the subcellular localization of macromolecules by vesicular trafficking between organelles. By chemical genomics, it was found that *ScDFG10* function is required for Sortin2 mode-of-action in *Saccharomyces*. This compound is a chemical that alters the *Saccharomyces* and *Arabidopsis thaliana* Endomembrane System. Also and surprisingly, *ScDFG10* has been linked to dolichol biosynthesis in yeast, an essential lipid in the protein N-glycosylation process.

In this work the function of three *Arabidopsis* orthologs of *ScDFG10* was studied. The cellular function of *AtDFG10-1* and *AtDFG10-2* proteins was analyzed by functional complementation of *ScDFG10* in the mutant *dfg10Δ*. We showed that *AtDFG10-2* is able to complement *ScDFG10* function, suggesting that *AtDFG10-2* shares the same function as *ScDFG10*. Therefore, it could be expected that *AtDFG10-2* accomplishes a function related to protein N-glycosylation in *Arabidopsis*, taking into account the conservation of mechanisms between yeast and plants. On the other hand, *AtDFG10-1* did not complement *ScDFG10* function in this heterologous system, probably because of its unexpected vacuolar localization.

The function of *AtDFG10s* in *Arabidopsis* was performed by studying the effects of its loss-of-function in this species. Single homozygous T-DNA insertional mutant lines were used, in which the insertion provoked a partial and a total decrement in *AtDFG10-1* and *AtDFG10-2* expression in their respective mutant lines. Also, we

generated the double homozygous mutant line *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. *AtDFG10s* loss-of-function provoked induction of lateral root formation. This increase in lateral roots was reverted by *AtDFG10* gene restitution in the simple mutant lines indicating that *AtDFG10s* function is linked to lateral root formation in *Arabidopsis*.

Furthermore, *AtDFG10s* loss-of-function conferred higher resistance to Sortin2 gravitropic response disturbance. Indeed, the *AtDFG10s* loss-of-function phenocopied the stimulatory effect of Sortin2 on lateral root development and conferred increased resistance to the effect of Sortin2 on lateral root induction and on endocytic trafficking acceleration. These results suggest that *AtDFG10s* function is important in Sortin2 mode-of-action; therefore, it could participate in endocytic trafficking which is required for lateral root formation in *Arabidopsis*.

Interestingly, *AtDFG10s* loss-of-function conferred reduced sensitivity to the protein N-glycosylation inhibitor, Tunicamycin. This is a hint that *AtDFG10s* function is involved in protein N-glycosylation in *Arabidopsis*.

Overall, these results suggest a functional link between protein N-glycosylation and endocytic trafficking and its regulation in *Arabidopsis thaliana* which influences lateral root formation in this species.



## 1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos pluricelulares pertenecientes a la división Eucariota las cuales se caracterizan por ser esencialmente sésiles, tener la capacidad de transformar la energía del sol en energía química mediante la fotosíntesis y poseer una extraordinaria capacidad de regeneración en concomitancia al desarrollo post-embrionario de la mayoría de sus tejidos (Taiz, L. & Zeiger, E. 2002).

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para responder de manera adecuada a los estímulos del medio ambiente donde se encuentran. Estos estímulos modulan procesos celulares que impactan en la morfogénesis, el crecimiento y la diferenciación del organismo vegetal. Una de las bases fundamentales de la generación y regulación de estos procesos celulares, además de la modulación del desarrollo vegetal y mantenimiento de la homeostasis celular, yace en el funcionamiento del Sistema de endomembranas dentro de la unidad estructural del organismo, la célula vegetal (Taiz, L. & Zeiger, E. 2002; Surpin, M. & Raikhel, N. 2004; Dettmer, J. & Friml, J. 2011).

### **1.1.- El Sistema de endomembranas vegetal: rutas de tráfico y organelos participantes.**

El Sistema de endomembranas es un componente intracelular mayormente conservado entre los eucariontes cuya función basal es la correcta destinación del

material proteico y lipídico además de tipo polisacáridos, a lugares donde ejercen su función mediante el tráfico de vesículas entre los diferentes organelos que lo constituyen (Alberts, B. & col. 2008). Este material puede ser un constituyente luminal o de membrana de organelos o de la membrana plasmática o bien del espacio extracelular incluida la pared celular vegetal. Existe consenso en que el tráfico vesicular de los diferentes componentes subcelulares del Sistema de endomembranas es un proceso altamente regulado en diferentes niveles. La formación de las vesículas está controlada por proteínas de cubierta que son reclutadas por proteínas GTPasa monoméricas (Bassham, D. & col. 2008). El reclutamiento vesicular al destino subcelular específico, está comandado también por otras GTPasa monoméricas de asociación a membrana denominadas Rabs; el reconocimiento y fusión de las membranas de la vesícula con las del organelo de destino, está mediado por las proteínas SNAREs (Lipka, V. & col. 2007; Bassham, D. & col., 2008; Lycett, G. 2008).

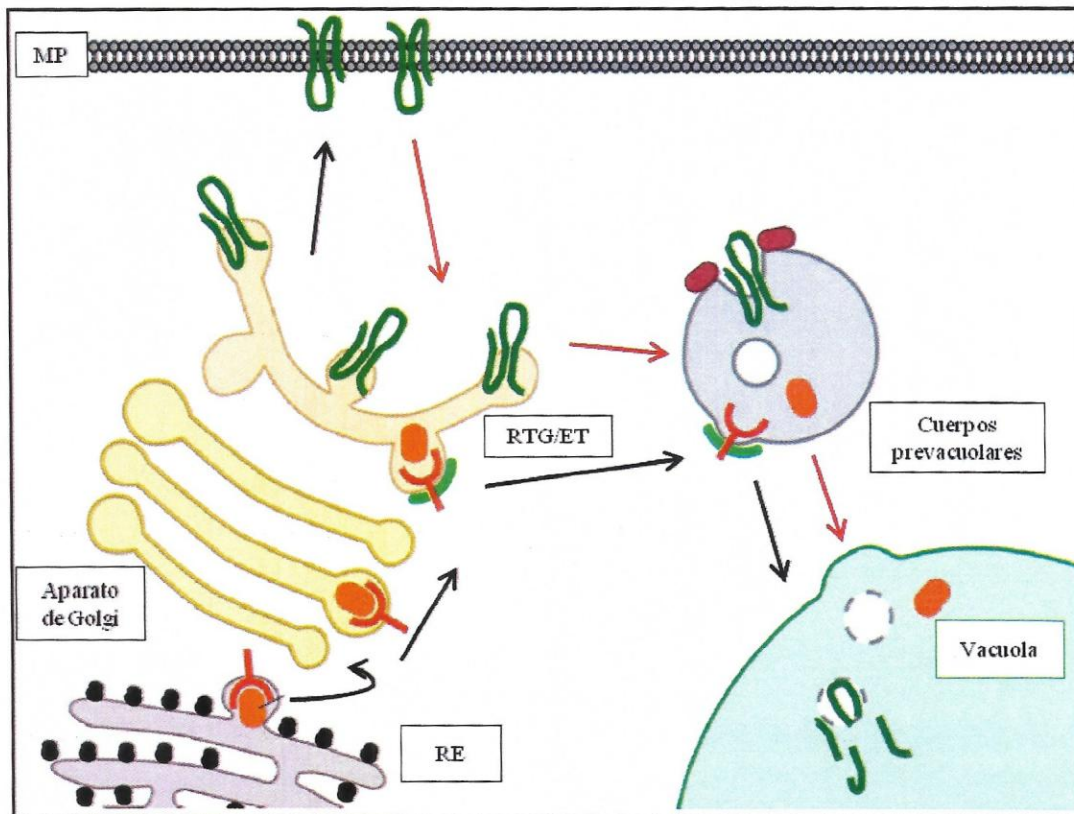
El fino control del tráfico vesicular configura dos rutas principales: la ruta secretoria y la ruta endocítica (Figura 1). La ruta secretoria se define clásicamente como el flujo vesicular de dirección anterógrada que comienza en el Retículo endoplasmático con la síntesis de proteínas en Ribosomas que interactúan con componentes de la membrana de este compartimiento y permiten el transporte del polipéptido en síntesis al lumen del Retículo (Nicchitta, C. 2002; Moreau, P. & col. 2007). Mientras los polipéptidos son transportados, algunos sufren modificaciones post-traduccionales como la N-glicosilación de proteínas que consiste en la adición de un árbol de oligosacáridos a su estructura en un número que depende de la proteína en síntesis (Pattison, P. & Amtmann, A. 2008). Este tipo de modificaciones son importantes para que chaperonas y

proteínas responsables de la formación de puentes disulfuros asistan a la proteína para alcanzar la conformación tridimensional apropiada (Liu, J. & Howell, S. 2010). Luego, las proteínas que son plegadas correctamente son transportadas al Aparato de Golgi (Bassham, C. & col. 2008). En este compartimiento, se procesa el árbol de oligosacáridos transferido a la proteína en el Retículo endoplasmático (Nebenführ, A. & Staehelin, L. 2001; Lycett, G. 2008). Las proteínas transportadas en la ruta secretoria llegan a la red trans-Golgi. Este organelo ha sido descrito en plantas recientemente como un compartimiento independiente del aparato de Golgi donde las rutas secretorias y endocíticas convergen (Viotti, C. & col. 2010). En este compartimiento, el tráfico anterógrado diverge en dos ramas principales. Una es la ruta de secreción donde las proteínas son secretados a la membrana plasmática y/o apoplasto (Bassham C. & cols. 2008). La otra ruta la siguen las proteínas que son destinadas hacia otros organelos como el compartimiento pre-vacuolar y consecutivamente la vacuola (Jolliffe, N.A. & col. 2005; Richter, S. & col. 2009). Los compartimientos pre-vacuolares o cuerpos multivesiculares son endosomas tardíos que provienen de la maduración de los endosomas tempranos (Scheuring, D. & col. 2011). Presentan vesículas intraluminales originadas por su propia invaginación, las cuales son necesarias para la degradación selectiva de proteínas (Robinson, D. & col. 2008; Scheuring, D. & col. 2011). En plantas, se ha evidenciado la existencia de dos tipos de vacuolas: una de almacenaje, la cual está relacionada a la acumulación de macromoléculas en tejidos seminales, y otra lítica, relacionada con la degradación de diferentes tipos de macromoléculas como proteínas y lípidos (Jolliffe, N. & col. 2005; Bassham, C. & col. 2008).

Por otra parte, la ruta endocítica comienza con la endocitosis a nivel de la membrana plasmática, la cual es definida como la internalización de moléculas que se encuentran en el medio extracelular y/o en la misma membrana plasmática a través de la invaginación de esta membrana. Se ha descrito que esta invaginación está comandada en parte por la acción de proteínas de cubierta denominadas Clatrina en conjunto con proteínas adaptadoras que interactúan con Clatrina, algunos componentes de la membrana y también con los microfilamentos de actina (Surpin, M. & Raikhel, N. 2004; Robinson, D. & col. 2008). Se ha descrito que el material endocitado sigue la ruta vacuolar clásica: red trans-Golgi/endosomas tempranos – compartimientos pre-vacuolares – vacuola. Sin embargo, se ha propuesto la existencia de otros compartimientos funcionalmente diferentes a los descritos anteriormente, los endosomas de reciclaje (Geldner, N. & col. 2003). Estos últimos poseen una identidad distinta a la red trans-Golgi/endosomas tempranos y a la de los compartimientos pre-vacuolares ya que no codistribuyen con ninguno de estos dos compartimientos y por el contrario poseen marcadores propios de tipo proteico como GNOM, un factor de intercambio de GTP en proteínas GTPasa (Geldner, N. & col. 2003). Estos endosomas de reciclaje están involucrados en la endocitosis constitutiva y posterior exocitosis de proteínas como, por ejemplo, los facilitadores de influjo y eflujo de la hormona auxina (Richter, S. & col. 2009; Reyes, F. & col. 2011).

Además de la existencia de las rutas de tráfico descritas, hay evidencia de otras rutas de secreción que involucran otros compartimientos terminales como los peroxisomas y los plastidios (Matheson, L. & col. 2006; Bassham, C. & col. 2008). También se ha reportado la existencia de rutas denominadas no convencionales como

por ejemplo, la secreción al apoplasto de los cuerpos intraluminales multivesiculares (Ding, Y. & col. 2012).



**Figura 1 – Rutas secretoria y endocítica clásicas del Sistema de endomembranas.** Las proteínas luminales e integrales de membrana son sintetizados en el Retículo endoplasmático (RE) y trafican por la ruta secretoria (flechas negras) hacia o a través del Aparato de Golgi, Red transGolgi (RTG/ET) y son destinados a la membrana plasmática (MP) o a la vacuola. Componentes residentes de la membrana plasmática son internalizados por endocitosis y trafican hacia la vacuola por la ruta endocítica (flechas rojas) vía compartimentos intermedios: endosomas tempranos (RTG/ET) y cuerpos prevacuolares. Figura modificada de Reyes F. & cols., 2011.

## 1.2.- Sistema de endomembranas y su importancia en procesos celulares vegetales.

La modulación de las rutas tanto secretoria como endocítica es muy importante en diferentes procesos celulares. La placa celular es una estructura membranosa que

crece desde el centro del plano de división donde se establece la pared celular primaria que separará las células hijas (Jürgens, G. 2005). La cooperación entre la ruta de secreción y endocítica es clave para el establecimiento de la placa celular en la fase mitótica de la citoquinesis (Jürgens, G. 2005). El control de la disposición de la placa celular puede causar asimetría entre las células hijas. Como en vegetales no existe migración celular, la división celular asimétrica cobra mayor importancia, ya que es uno de los mecanismos que promueve la diferenciación de linajes celulares y por ende la formación de nuevos tejidos (de Smet, I. & Beeckman, T. 2011). Por otra parte, muchos compuestos son detectados en la membrana plasmática, por lo tanto la regulación de la abundancia tanto de receptores, transportadores y otros componentes de la membrana mediante su relocalización afecta críticamente la habilidad que poseen las células para responder a estos estímulos. Un ejemplo clásico es el transportador de boro, BOR1, el cual se ha descrito que a altas concentraciones de ácido bórico, es endocitado y destinado a los compartimientos prevacuolares y a la vacuola donde finalmente es degradado (Takano, J. & col, 2005). Esta modulación endocítica también permite controlar la señalización de receptores tipo quinasa como el sensor de flagelina, FLS2 o el sensor de la hormona brasinoesteroides, BRI1. La endocitosis de estos receptores mediada por su unión al ligando, es necesaria para la transducción de la señal y la activación transcripcional de genes relacionados a la respuesta a patógenos (Robatzek, S. & col. 2006) y a la fitohormona esteroideal (Geldner, N. & col, 2007). Es importante considerar que la regulación de la localización subcelular de los distintos facilitadores de influjo y eflujo de auxina define el flujo de esta fitohormona dentro de los distintos tejidos vegetales y es crucial en los procesos de organogénesis (Kleine-Vehn, J. & col.

2008; Men, S. & col. 2008; Petrášek, J. & Friml, J. 2009). El flujo de auxina es crucial para el establecimiento del eje apical-basal en el embrión y su desarrollo embrionario, así como también en el desarrollo post-embrionario de estructuras como las raíces laterales (Petrášek J. & Friml J., 2009; Petricka, J. & col. 2012). También se ha reportado que la morfología de los compartimientos subcelulares es importante en la formación de algunas estructuras vegetales, ya que proteínas GTPasas ligadas a la remodelación del Retículo endoplasmático cumplen una función importante en la constitución de los pelos radiculares (Chen, J. & col. 2011).

Todos estos antecedentes muestran que la plasticidad del Sistema de endomembranas vegetal tanto a nivel de la modulación de sus rutas de tráfico como a nivel de la regulación de la morfología de los organelos, modula la polaridad celular y la formación de tejidos vegetales, lo cual está entrelazado con la comunicación intercelular existente mediada por señales autocrinas, paracrinas y en la respuesta frente a estímulos exógenos bióticos y/o abióticos. Esto sitúa al Sistema de endomembranas como una de las bases de la homeostasis celular y del desarrollo del organismo vegetal.

### **1.3.- Genómica química: Sortin2, un compuesto químico que altera el Sistema de endomembranas.**

En base a lo esencial de las funciones del Sistema de endomembranas, no es de extrañar que la pérdida de función de sus componentes provoque alteraciones graves en todo el organismo. De hecho, se ha reportado que mutaciones en componentes reguladores del tráfico del Sistema de endomembranas, proteínas relacionadas a la destinación a la membrana plasmática y biogénesis de organelos, producen alteraciones

tan graves como la pérdida de la polaridad celular, la morfología del tejido foliar y radicular, alteración de la respuesta a patógenos y en muchas ocasiones alteraciones tan extremas como letalidad gametofítica y embrionaria (Lukowitz, W. & col. 1996; Chen, J. & col. 2001; Rojo, E. & col., 2001; Assaad, F. & col. 2004; Hong, Z. & col. 2008; Spitzer, C. & col. 2009). Esto sumado al establecimiento de una multitud de interacciones entre los diferentes componentes del Sistema de endomembranas como su integración con otros componentes celulares, limitan de sobremanera el descubrimiento y estudio de nuevos componentes del Sistema de endomembranas mediante Genética convencional, una de las herramientas claves dentro de la investigación en Biología vegetal. Estos factores promueven la utilización de otras estrategias de estudio que permitan sobrepasar las barreras de la investigación.

La Genética química es una estrategia que usa moléculas de bajo peso molecular que puedan modular un fenotipo en particular relacionado a un proceso biológico a estudiar (Tóth, R. & van der Hoorn, R. 2009). El uso de compuestos químicos de forma exógena permite alterar la función de proteínas claves en un proceso biológico mediante su interacción con la/s proteína/s, lo cual es ventajoso si existe la redundancia génica, la cual es una característica de los organismos vegetales. Idealmente, la acción de los compuestos químicos es inducible y reversible por lo que se pueden agregar o retirar en diferentes estados del desarrollo, superando así la letalidad embrionaria y permitiendo recuperar el organismo posterior al tratamiento. Además, provee información sobre la dinámica de la función alterada *in vivo*. Por lo tanto, la Genética química entrega información complementaria a la de los estudios de Genética convencional (Tóth, R. & van der Hoorn, R. 2009).



La Genética química se ha enriquecido con el uso de herramientas que permiten el manejo a gran escala, tanto en la síntesis y manipulación de compuestos químicos, en la utilización de bases de datos de diferente índole, banco de mutantes y en el análisis a gran escala del fenotipo esperado en presencia del químico. A esta estrategia se le denomina Genómica química (Hicks, G. & Raikhel, N. 2012) la cual ha robustecido el estudio del Sistema de endomembranas, ya que ha aportado novedosos compuestos que permiten identificar y diferenciar rutas de tráfico distintas a las conocidas actualmente que son afectadas con compuestos ampliamente utilizados como Brefeldina A o Wortmanina (Robert, S. & col. 2008; Drakakaki, G. & col. 2011; Hicks, G. & Raikhel, N., 2012). En consecuencia, abre escenarios muy auspiciosos, ya que posibilita la caracterización de nuevos factores importantes que están involucrados en el establecimiento y/o en la dinámica de la ruta alterada por el compuesto químico *in vivo*. En este sentido, una de las iniciativas de Genómica química caracterizó los compuestos químicos llamados *Sorting Inhibitors* o Sortins (Zouhar, J. & col. 2004). Específicamente, Sortin2 altera la destinación de la proteasa vacuolar CPY en *Saccharomyces cerevisiae* y su homólogo AtCPY en *Arabidopsis thaliana*, lo cual sugiere mecanismos conservados en el establecimiento de la ruta secretoria vacuolar entre ambos organismos (Zouhar, J. & col. 2004; Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). En estudios de mutantes de *Saccharomyces* hipersensibles a Sortin2 se relacionó el tráfico a los compartimientos endosomales que preceden a la localización vacuolar como el blanco celular más probable de Sortin2 (Norambuena, L. & col. 2008). Esta relación es respaldada al documentarse recientemente que uno de los efectos celulares de Sortin2 en *A. thaliana* es la inducción del tráfico endocítico y que este efecto impacta

negativamente en la reorientación radicular al cambio del vector de gravedad (Pérez, P. 2009) y positivamente en la formación de raíces laterales de forma independiente a la activación del complejo receptor intranuclear de la hormona Auxina (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012).

#### **1.4.- *ScDFG10* participa en la acción celular de Sortin2 y en la N-glicosilación de proteínas.**

Para discriminar componentes importantes en la acción celular de Sortin2 y apuntando a la identificación de blancos moleculares de este compuesto químico, se buscó a gran escala mutantes en *Saccharomyces cerevisiae* que fueran resistentes a la acción de este compuesto en la secreción de CPY (Norambuena, L. Datos no publicados). Se encontraron 6 genes cuya delección en *Saccharomyces* provoca la resistencia al efecto de Sortin2. De ellos, *ScDFG10* es uno de los cuatro genes cuyos productos proteicos poseen un vínculo con el Sistema de endomembranas (Norambuena, L. resultados no publicados).

En primera instancia, *ScDFG10* fue identificado como un gen importante para el establecimiento del crecimiento filamentoso de *Saccharomyces* en condiciones de falta de nutrientes (Mösch, H. & Fink, G. 1997). Sorprendentemente, *ScDFG10* fue relacionado fuertemente a la biosíntesis de dolicol, ya que su deficiencia provoca una disminución en la cantidad de dolicol e interesantemente una acumulación de sus precursores, los poliprenoles (Cantagrel, V. & col. 2010). La N-glicosilación de proteínas es una modificación co/post-traducciona conservada entre mamíferos, levaduras y plantas (Helenius, A. & Aebi, M. 2004; Pattison, R. & Amtmann, A. 2008).

Como se mencionó anteriormente, corresponde a la transferencia en bloque de un árbol de oligosacáridos denominado N-glicano, compuesto de 14 monosacáridos, por el complejo multimérico oligosacariltransferasa (Pattison, R. & Amtmann, A. 2008; Liu, J. & Howell, S. 2010; Matsui, T. & col. 2011). Se ha descrito que dolicol es clave en la N-glicosilación proteica, ya que este lípido, en su forma dolicol fosfato, es el aceptor del primer oligosacárido constituyente del N-glicano, cuya transferencia al lípido ocurre en el Retículo endoplasmático (Pattison, P. & Amtmann, A. 2008; Jones, M. & col. 2009). Esto es consistente con el hecho de que la mutante del gen *ScDFG10* posea defectos en la N-glicosilación de proteínas (Cantagrel, V. & col. 2010).

Las rutas del Sistema de endomembranas y muchos de sus constituyentes funcionales son bastante conservados entre levaduras y plantas. La acción de Sortin2 alterando la ruta de secreción de CPY es similar en ambos modelos de estudio (Zouhar, J. & col. 2004; Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). En consecuencia, es bastante probable que los genes de *Arabidopsis* que sean ortólogos de los genes identificados en *Saccharomyces* codifiquen productos proteicos que participen en los mecanismos moleculares de la acción de Sortin2 en *Arabidopsis* y que compartan las funciones moleculares biológicas en el Sistema de endomembranas descritas en *Saccharomyces*. Anteriormente, se identificó mediante una búsqueda bioinformática, a tres loci en *A. thaliana* denominados *At2g16530*, *At5g16010* y *At1g72590*, cuyos productos proteicos presentaron un porcentaje de similitud en torno al 50% con respecto a *ScDFG10* (Rubilar, C. 2010). Estos loci se denominaron *AtDFG10-1*, *AtDFG10-2* y *AtDFG10-3*, respectivamente (Rubilar, C. 2010). El análisis bioinformático informó que los tres candidatos *AtDFG10s* comparten con *ScDFG10* características similares: presentan 5 a

6 dominios transmembranas y un dominio funcional denominado 5- $\alpha$ -esteroide reductasa que comprende los dos segmentos transmembranas ubicados en el extremo carboxilo terminal de cada proteína (Rubilar, C. 2010). Esto indicaría una preservación de la estructura terciaria de los productos proteicos estudiados. Es más, tanto el porcentaje de similitud a ScDFG10 como la ubicación relativa del dominio funcional en las AtDFG10s son similares a SRD5A3, una proteína capaz de reducir poliprenoles en humanos y que rescata el fenotipo deficiente en la abundancia de dolicol y en la N-glicosilación de proteínas de la mutante de *ScDFG10* en *S. cerevisiae* (Cantagrel, V. & col. 2010).

Con los argumentos descritos anteriormente, se plantea que los genes *AtDFG10s* poseen una función importante tanto en la acción de Sortin2 en *A. thaliana* ya sea a nivel fisiológico y celular, así como también en el proceso de N-glicosilación de proteínas.

## 2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1- Hipótesis.

Los productos proteicos de los genes *AtDFG10s* participan en el proceso de síntesis de dolicol y son importantes para el efecto fisiológico y celular que posee Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*.

### 2.2.- Objetivo General.

Evaluar la función de los genes *AtDFG10s* y su importancia en el efecto fisiológico y celular de Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*.

### 2.3.- Objetivos específicos.

I.- Evaluar la función celular de los genes *AtDFG10s* mediante la evaluación de la complementación funcional del gen *ScDFG10*

II.- Evaluar la función de los genes *AtDFG10s* en la fisiología de las plantas y su importancia en el efecto que poseen Sortin2 y Tunicamicina en *Arabidopsis thaliana*.

III.- Corroborar la función de los genes *AtDFG10s* mediante el rescate de los fenotipo/s alterado/s en *Arabidopsis thaliana* deficientes en los respectivos genes *AtDFG10s*.

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- Material biológico.

Las diferentes líneas utilizadas de *Arabidopsis thaliana* y las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli* que se utilizaron en este trabajo se especifican en la Tabla 1, sección a, b, c y d, respectivamente.

##### 3.1.1.- Cultivo de bacterias.

Los cultivos de *Escherichia coli* fueron crecidos en medio de cultivo LB el cual se compone de triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5%% p/v, NaCl 0,8%% p/v y además agar 1,6 % p/v para preparar cultivo sólido. Se utilizaron los siguientes antibióticos para seleccionar las células de *Escherichia coli* transformadas con los vectores apropiados: Espectinomicina 100µg/mL para seleccionar las células transformadas con el vector pCR8; Ampicilina 100 µg/mL para los clones transformados con los vectores de expresión en levaduras p426GPD y Kanamicina 50 µg/mL para los clones transformados con los vectores de expresión en plantas pGWB. Para todos los cultivos, la temperatura y el tiempo de incubación fue de 37°C por 16 horas, aproximadamente.

**Tabla 1 - Material biológico utilizado.**

Tabla 1.a.- Se detalla las características génicas y la resistencia a antibióticos de los diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas.

Nombre	Alelo	Alteración génica	Vector transformante	Antibiótico de selección
wt (Col-0)	--	--	--	--
<i>atdfg10-1-1</i>	SALK_117025	Inserción de T-DNA en homocigosis en <i>AtDFG10-1</i>	--	Kanamicina
<i>atdfg10-2-1</i>	SALK_105485	Inserción de T-DNA en homocigosis en <i>AtDFG10-2</i>	--	Kanamicina
<i>atdfg10-1-1/1</i> <i>atdfg10-2-1</i>	SALK_117025 y SALK_105485	Inserción doble en homocigosis de T-DNA en <i>AtDFG10-1</i> y <i>AtDFG10-2</i>	--	Kanamicina
<i>atdfg10-1-1/35S::X</i>	SALK_117025	Inserción de T-DNA en homocigosis en <i>AtDFG10-1</i>	pGWB8	Higromicina Kanamicina
<i>atdfg10-2-1/35S::X</i>	SALK_105485	Inserción de T-DNA en homocigosis en <i>AtDFG10-2</i>	pGWB8	Higromicina Kanamicina
<i>atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1</i>	SALK_117025	Inserción de T-DNA en homocigosis en <i>AtDFG10-1</i>	pGWB8- <i>AtDFG10-1c</i>	Higromicina Kanamicina
<i>atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2</i>	SALK_105485	Inserción de T-DNA en homocigosis en <i>AtDFG10-2</i>	pGWB8- <i>AtDFG10-2c</i>	Higromicina Kanamicina

Tabla 1.b.- Se detalla la cepa parental, el vector transformante y la consiguiente resistencia a antibióticos que caracterizan a las diferentes cepas de *Escherichia coli* utilizadas.

Nombre	Parental	Vector transformante	Antibiótico de selección
wt	Mach1 <sup>TM</sup>	--	--
pCR8- <i>AtDFG10-1c</i>	Mach1 <sup>TM</sup>	pCR8- <i>AtDFG10-1c</i>	Espectinomicina
pCR8- <i>AtDFG10-2c</i>	Mach1 <sup>TM</sup>	pCR8- <i>AtDFG10-2c</i>	Espectinomicina
pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -EGFP	Mach1 <sup>TM</sup>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -eGFP	Ampicilina
pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -HA	Mach1 <sup>TM</sup>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -HA	Ampicilina
pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -EGFP	Mach1 <sup>TM</sup>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -eGFP	Ampicilina
pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -HA	Mach1 <sup>TM</sup>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -HA	Ampicilina
PGWB5- <i>AtDFG10-1c</i>	Mach1 <sup>TM</sup>	PGWB5- <i>AtDFG10-1c</i>	Kanamicina
PGWB8- <i>AtDFG10-1c</i>	Mach1 <sup>TM</sup>	PGWB8- <i>AtDFG10-1c</i>	Kanamicina
PGWB5- <i>AtDFG10-2c</i>	Mach1 <sup>TM</sup>	PGWB5- <i>AtDFG10-2c</i>	Kanamicina
PGWB8- <i>AtDFG10-2c</i>	Mach1 <sup>TM</sup>	PGWB8- <i>AtDFG10-2c</i>	Kanamicina

Tabla 1.c.- Se detalla la cepa parental, el vector transformante y la consiguiente resistencia a antibióticos que caracterizan a las diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas.

Nombre	Parental	Vector transformante	Antibiótico de selección
Wt	GW3101	--	Gentamicina, Rifampicina
pGWB5	GW3101	pGWB5	Gentamicina, Kanamicina, Rifampicina
pGWB8	GW3101	pGWB8	Gentamicina, Kanamicina, Rifampicina
pGWB5- <i>AtDFG10-1c</i>	GW3101	pGWB5- <i>AtDFG10-1c</i>	Gentamicina, Kanamicina, Rifampicina
pGWB8- <i>AtDFG10-1c</i>	GW3101	pGWB8- <i>AtDFG10-1c</i>	Gentamicina, Kanamicina, Rifampicina
pGWB5- <i>AtDFG10-2c</i>	GW3101	pGWB5- <i>AtDFG10-2c</i>	Gentamicina, Kanamicina, Rifampicina
pGWB8- <i>AtDFG10-2c</i>	GW3101	pGWB8- <i>AtDFG10-2c</i>	Gentamicina, Kanamicina, Rifampicina

Tabla 1.d.- Se detalla la cepa parental, las características génicas y la auxotrofia que presentan las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Nombre	Parental	Alteración génica	Vector transformante	Auxotrofia
wt	BY4342	--	--	his- leu- lis- ura-
<i>dfg10</i> $\Delta$	BY4342	Delección en <i>ScDFG10</i>	--	his- leu- lis- ura-
<i>dfg10</i> $\Delta$ -HA	<i>dfg10</i> $\Delta$	Delección en <i>ScDFG10</i>	pAG426GPD-HA	his- leu- lis-
<i>dfg10</i> $\Delta$ - <i>AtDFG10-1c</i> -HA	<i>dfg10</i> $\Delta$	Delección en <i>ScDFG10</i>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -HA	his- leu- lis-
<i>dfg10</i> $\Delta$ - <i>AtDFG10-1c</i> -eGFP	<i>dfg10</i> $\Delta$	Delección en <i>ScDFG10</i>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -eGFP	his- leu- lis-
<i>dfg10</i> $\Delta$ - <i>AtDFG10-2c</i> -HA	<i>dfg10</i> $\Delta$	Delección en <i>ScDFG10</i>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -HA	his- leu- lis-
<i>dfg10</i> $\Delta$ - <i>AtDFG10-2c</i> -eGFP	<i>dfg10</i> $\Delta$	Delección en <i>ScDFG10</i>	pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -eGFP	his- leu- lis-



Para crecer cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó medio LB a 28°C por 2 días. Para seleccionar las células transformadas con los vectores de expresión en plantas serie pGWB, los cultivos fueron crecidos en medio LB con los antibióticos Kanamicina 50 µg/mL, Rifampicina 10 µg/mL y Gentamicina 25 µg/mL.

### 3.1.2.- Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para el crecimiento de las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó el medio de cultivo completo YPD el cual se compone de peptona 2% p/v, extracto de levadura 1% p/v y glucosa 2% p/v. Para el medio completo sólido se agregó agar 2% p/v. Para seleccionar las cepas de levaduras transformadas con los vectores de expresión de levadura serie pAG426GPD, los cultivos se crecieron en medio mínimo YMM el cual se compone de YNB sin aminoácidos ni (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,167% p/v (Becton, Dickinson and Company), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,502% p/v, glucosa 2% p/v y mezcla 1 y 2 de aminoácidos a 0,07% p/v y 0,045% p/v, respectivamente. La mezcla 1 se compone de Alanina, Arginina, Cisteína, Leucina, Lisina, Treonina y Triptófano a 14,3% p/p cada uno; la mezcla 2 se compone de Aspartato, Histidina, Isoleucina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Tirosina y Valina 11,1% p/p cada uno.

Para crecer las cepas auxótrofas a uracilo en medio mínimo YMM, el cultivo fue suplementado con uracilo 0,1% p/v. La temperatura y tiempo de incubación para los cultivos de *Saccharomyces* fue de 28°C por 2 días.

### 3.1.3.- Obtención y transformación de células quimio-competentes.

Para obtener células quimiocompetentes de *Escherichia coli*, primero se tomó 1 mL de células de la cepa Mach1<sup>TM</sup> y se inoculó en 250 mL de medio SOB, el cual se compone de triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mM. Se creció el cultivo en agitación moderada hasta D.O.<sub>600</sub> 0,3, se centrifugó a 3000 x g por 10 minutos a 4°C descartándose el sobrenadante y se agregó 40 mL de solución CCMB80 estéril incubándose en hielo por 20 minutos. La solución CCMB80 contiene Acetato de potasio (CH<sub>3</sub>COOK) 10 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 80 mM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 20mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10mM, glicerol 10% v/v y ajustado a pH 6,4. El cultivo se centrifugó a 2000 x g por 8 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se agregó al sedimento 20 mL de solución CCMB80, ajustándose la D.O.<sub>600</sub> del cultivo a 1 - 1,5. Se incubó la suspensión en hielo por 20 minutos y se dividió en tubos de 1,5 mL volúmenes de 100 µL. Se dividió en volúmenes de 100 µL y se almacenó a -80°C.

Para transformar las células de *Escherichia coli* quimiocompetentes, se le agregó 100 ng del vector a una de estas alícuotas y se incubó por 30 minutos en hielo. Después se incubó a 42°C por 30 s y luego 2 minutos en hielo. Se le agregó 1 mL de medio LB para incubar posteriormente a 37°C por 1 hora. Se centrifugó y se resuspendió el sedimento en 100 µL de LB líquido y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar con los correspondientes antibióticos para su selección.

Para obtener células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*, primero se tomó 10 µL de un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa GW3101 en glicerol 20% v/v conservado a -80°C y se realizó un preinóculo en 100 mL de medio LB con los antibióticos Rifampicina 10 µg/mL y Gentamicina 25 µg/mL hasta que llegara a

una D.O.<sub>600</sub> de 0,5. El cultivo se centrifugó por 20 minutos a 3000 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM estéril. Se dividió en volúmenes de 100 µL, se incubó en nitrógeno líquido para luego almacenarlas a -80°C.

La transformación de las células de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes se realizó con una alícuota de células quimio-competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, se le agregó entre 0,1 a 1 µg del vector de la serie pGWB y se congeló en nitrógeno líquido durante 5 minutos. Se descongeló a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se le añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 28°C por 12 horas. Se centrifugó el cultivo para sembrarlo en placas con medio LB-agar y los correspondientes antibióticos para su selección, incubándose posteriormente a 28°C por 2 días.

Para obtener células electrocompetentes de *Saccharomyces cerevisiae*, se tomó 10 µL de un cultivo de levaduras *dfg10Δ* en glicerol 20% v/v conservado a -80°C y se incubó en 100 mL de medio YPD en agitación moderada a 28°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> entre 1,3 a 1,5. Se lavó el cultivo con agua estéril a 4°C, centrifugando por 6 minutos a 5000 rpm por cada lavado, repitiéndose una vez más. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 4 mL de Sorbitol 1 M estéril a 4°C. Se dividió la suspensión en volúmenes de 40 µL y se guardó a 4°C.

Para transformar una alícuota de células de *Saccharomyces cerevisiae* electrocompetentes, se le añadió 100 ng del vector y se incubó en hielo por 5 minutos. Se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 2 mm y se expuso a un pulso eléctrico de 1,5 KV, 25 µF, 200 Ω, una constante de tiempo entre 4,5 a 5 ms a

temperatura ambiente. Luego se agregó 1 mL de medio YPD, incubándose a 28°C por 60 minutos. Este cultivo fue centrifugado por 4 minutos a 3000 x g descartándose todo el sobrenadante. Se lavó el sedimento y se resuspendió en 1mL de medio mínimo YMM. Se sembró 100 µL de cultivo en placas de Petri con medio YMM-agar, incubándose a 28°C por 2 días.

Para controlar los experimentos de transformación, se utilizó en cada serie de transformación un control negativo con cepas quimiocompetentes sin transformar y un control positivo el cual consistió en utilizar cepas quimiocompetentes transformadas con 100 ng del vector ya probado anteriormente.

#### 3.1.4.- Esterilización y estratificación de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 silvestres y las líneas mutantes utilizadas fueron esterilizadas mediante el siguiente protocolo: se lavaron las semillas en 1 mL de etanol 95% v/v por 5 minutos, para después retirar la solución y agitar por 15 minutos en una solución de etanol 70% v/v con Tritón®X-100 0,1% v/v. Por último, se lavaron las semillas en agua estéril 4 veces, retirando el líquido cada vez.

Para estratificar las semillas, se dejaron en 1 mL de agua estéril a 4°C y en oscuridad por 2 días. Para asegurar la esterilidad del procedimiento, se realizó todo el proceso bajo una cámara de flujo laminar LAMINAIRE.

#### 3.1.5.- Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas esterilizadas y estratificadas se sembraron en condiciones estériles en placas cuadradas que contenían medio de cultivo MS-agar 0,5X [mioinositol 0,01%

p/v, MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato) 0,05% p/v, sacarosa 1% p/v medio de cultivo Murashige y Skoog 0,22% p/v (Phyto Technology Laboratories #MS19), fitoagar en grado de micropropagación 0,7% p/v, ajustado a pH 5,7] o 1X (sacarosa 2% p/v, medio de cultivo Murashige y Skoog 0,44% p/v). Las plantas se crecieron verticalmente en condiciones controladas de temperatura (22°C), fotoperiodo (16 horas de luz/ 8 horas oscuridad) y luminosidad (aproximadamente 4000 lux).

Para obtener semillas tanto de líneas mutantes como plantas silvestres, las plantas parentales de 3 semanas de edad fueron traspasadas a un sustrato inerte.. Este soporte fue embebido en un medio de cultivo hidropónico 1X (Gibeaut, D.M. & col. 1997). Su versión 100X se compone de: KNO<sub>3</sub> 125 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 150 mM, MgSO<sub>4</sub> 75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5 mM, MnSO<sub>4</sub> 1 mM, ZnSO<sub>4</sub> 200 μM, CuSO<sub>4</sub> 150 μM, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 10 mM y Sprint 330 7,7 mM [Fe quelado en DTPA (Ácido di-etilen-triamino-pentaacético)], ajustado a pH 5.

Luego de varias semanas, las plantas con semillas maduras fueron cubiertas con un capuchón de papel y se les secó retirándoles casi la totalidad el medio hidropónico. Luego de que se secase la planta completa, se cosecharon las semillas. Estas fueron guardadas en sobres de papel y en oscuridad a temperatura ambiente.

### 3.1.6.- Tratamientos utilizando compuestos químicos en *Arabidopsis thaliana*.

Para evaluar la resistencia a Sortin2 de las diferentes líneas mutantes a nivel fisiológico, se sembraron semillas mutantes y silvestres en MS-agar 1X. A los 7 días de edad fueron traspasadas a placas de Petri que contenían medio MS-agar 1X con 25 μg/mL de Sortin2 previamente fotoactivadas por 4 días y su solvente DiMetilSulfÓxido

(DMSO) 1% v/v. Como control experimental, las plántulas se traspasaron a placas medio MS-agar 1X con DMSO 1% v/v, anteriormente expuestas a la luz. Se dispuso las plantas de forma perpendicular al vector de gravedad, se esperaron 4 días y se fotografiaron utilizando una cámara fotográfica Fujifilm modelo FINEPIX S1500.

Para evaluar la resistencia a Sortin2 de las líneas mutantes enfocada en el tráfico endocítico, se crecieron las plantas mutantes y silvestres por 7 días en MS-agar 1X y fueron incubadas en solución de MS líquido 1X con N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-(dietilamino)fenil)hexatrienil)piridinio dibromuro (FM4-64, Invitrogen) 5  $\mu$ M durante 15 minutos en oscuridad a 4°C. Luego, se traspasaron estas plántulas a una solución de medio MS-líquido con Sortin2 50  $\mu$ g/mL DMSO 1% v/v. Se tomaron imágenes a los 5 y 60 minutos después del traspaso a la solución de Sortin2 utilizando microscopía confocal (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012).

Para evaluar la resistencia a Tunicamicina de las líneas mutantes, se sembró las semillas silvestres y mutantes en una misma placa cuadrada con MS-agar 1X, Tunicamicina 0,1  $\mu$ g/mL y DMSO 1% v/v. Como control experimental se utilizó placas con MS-agar DMSO 1% v/v. A los 12 días después de la siembra, las plantas se fotografiaron evaluando el desarrollo foliar de cada línea (Zhang, H. & col. 2008; Nagashima, Y. & col. 2011). Alternativamente, se realizó el mismo tratamiento en plantas de 7 días crecidas verticalmente. En este caso, se dispuso las plantas de manera vertical por 14 días, después de los cuales se fotografiaron y se cuantificó el peso fresco.

### 3.1.7.- Obtención de la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*.

Se usaron plantas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* 5 semanas de edad crecidas en medio hidropónico que poseían flores a punto de abrir. Se emasculó utilizando un estereoscopio y pinzas Dumont 5. Un día después se examinó su estigma: si estaba receptivo, se procedió a polinizar cruzadamente, o sea, las flores emasculadas *atdfg10-1-1* estuvieron en contacto con las anteras de las flores de una planta *atdfg10-2-1* y viceversa. Se esperó a que se desarrollara la silicua y se cosechó.

La obtención de la línea mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* se realizó por la selección sucesiva de plantas en cada una de las tres generaciones posteriores a la cruce asistida mediante genotipificación por PCR utilizando la serie de partidores especificados en la Tabla 2, sección a.

### 3.1.8.- Transformación estable en *Arabidopsis thaliana* y selección de plantas transformadas.

Se tomó 10 µL de un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con un vector que porta el marco de lectura abierta (MLA) de un gen *AtDFG10* y se inoculó en 2 mL de medio LB con los antibióticos de selección respectivos a 28°C por 12 horas. Se escaló este cultivo a 30 mL de medio LB incubándolo en agitación hasta una D.O.<sub>600</sub> igual a 2. Se centrifugó el cultivo a 5.000 x g por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se agitó suavemente durante una hora en 15 mL de medio de infiltración, el cual se compone de sacarosa 5% p/v y Silwett L-77 0,05% v/v. Inflorescencias de plantas de las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* fueron sumergidas en este cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* por 5 segundos. Posteriormente, las plantas fueron colocadas por 24 horas en oscuridad. Luego, se

crecieron estas plantas en medio hidropónico para obtener sus semillas. Estas semillas fueron seleccionadas sembrándolas en placas que contenían medio MS-agar 1X suplementadas con el antibiótico Higromicina-B 25 µg/mL. Las plantas entre 10 a 14 días post-siembra resistentes al tratamiento, se traspasaron a placas de Petri con medio MS-agar 1X sin antibióticos y posteriormente al medio hidropónico para crecerlas y recolectar sus semillas. Además, se corroboró la transformación estable del gen de interés mediante la amplificación por PCR del gen en configuración sentido al promotor 35S utilizando partidores descritos en la Tabla 2, sección b. Para corroborar que el inserto transformante donde se encuentra el gen de interés se transmite de manera correcta a su progenie, las semillas que pertenecen a la progenie de una planta resistente a Higromicina y positiva en su genotipificación fueron sembradas y crecidas en medio MS-agar 1X suplementado con Higromicina-B 25 µg/mL y se analizó la segregación de la resistencia al antibiótico en la población.

### **3.2.- Análisis de DNA y RNA.**

#### **3.2.1.- Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana*.**

Se purificó DNA genómico a partir de una hoja de roseta de plantas entre 28 a 35 días de edad (aproximadamente 100 mg). Se molió la hoja con un pistilo previamente incubadas en nitrógeno líquido. Luego, se incubó una hora a 65°C en la solución tampón CTAB 2X (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 2% p/v, NaCl 1,4M, Tris HCl pH 8 100 mM, Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,1% v/v). Luego, se centrifugó a 13000 x g por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se le agregó 700 µL de la solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)



y se agitó por 5 minutos; se centrifugó a 8000 rpm por 5 min y se rescató la fase superior. Se repitió el paso anterior. Luego, se adicionó 650  $\mu\text{L}$  de 2-propanol y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 60 minutos para luego centrifugarse por 15 minutos a  $13000 \times g$ . Los últimos pasos consistieron en remover el sobrenadante, lavar el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% v/v. Luego de una breve centrifugación, se removió cuidadosamente el etanol y se dejó secar el sedimento. Finalmente se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de la solución tampón consistente en Tris HCl pH 8 10 mM y EDTA 1 mM. El DNA fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

**Tabla 2 - Partidores utilizados en las reacciones de PCR realizadas.**Tabla 2.a - Partidores asociados a la genotipificación de la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*.

Nombre partidor	Secuencia	Observaciones
AtActin4AA89_5'	CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT	Hibridan degeneradamente los marco de lectura abierto de los genes de Actina de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtActin4AA320_3'	GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT	
LBb1.3	ATT TTG CCG ATT TCG GAA C	Hibrida el extremo izquierdo del fragmento-inserto de T-DNA en las mutantes insercionales SALK y apuntando hacia fuera del inserto
S_117025_5'	AGA ATA TGT TGC GGT CAA CG	Hibridan en la secuencia promotora y en el 2° intrón del gen <i>AtDFG10-1</i> , respectivamente. Flanquean la ubicación donde se reportó la inserción del fragmento de T-DNA que caracteriza al alelo SALK_117025.
S_117025_3'	GCT TTC TCG TTT TCA ATC TGG	
S_105485_5'	AGG GAA CAC TTT GGG AGA T	Hibridan en la secuencia promotora y en el 2° exón del gen <i>AtDFG10-2</i> , respectivamente. Flanquean la ubicación donde se reportó la inserción del fragmento de T-DNA que caracteriza al alelo SALK_105485.
S_105485_3'	TAG CCA TCC CTC CAC TGT A	

Tabla 2.b - Partidores asociados a la amplificación fidedigna de los genes *AtDFG10s* y la genotipificación de colonias transformantes de *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* y de las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformantes.

Nombre partidor	Secuencia	Observaciones
OligoAP	CGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T	Hibrida la cola poliA de los transcritos.
At2g16530_F	CCT CGC ACG AGA ATT GAA GA	Hibridan los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen <i>AtDFG10-1</i> , respectivamente. Sustituye el codón de término TAA por TCG
At2g16530_R	CGA GTA GAC ATA AGG GAA AAT GGC	
At5g16010_F	CCC AAA ATT GCA GAA CCA G	Hibridan los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen <i>AtDFG10-2</i> , respectivamente. Sustituye el codón de término TAG por CAG
At5g16010_R.a	CTG GAA TAC AAA GGG AAT GAG A	
35S.pcambia.F	AGA ACT CGC CGT AAA GAC TG	Hibrida dentro del promotor 35S en dirección a la zona de recombinación de los vectores de la serie pGWB
HigroF	TTT GTG TAC GCC CGA CAG T	Hibridan internamente el gen Higromicina fosfotransferasa en los vectores de la serie pGWB
HigroR	AAG ACC TGC CTG AAA CCG A	
M13_F	GTAAAACGACGGCCAG	Hibrida una secuencia de la cadena 5' - 3', próxima a la zona de recombinación de los vectores de la serie pCR8
426GPD_exSMC_5'	CCT CAA TGG AGT GAT GCA ACC	Flanquean la zona de recombinación de los vectores de la serie pAG426GPD
426GPD_exSMC_3'	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGG	

### 3.2.2.- Protocolo de reacción de PCR y genotipificación del material biológico.

El protocolo de amplificación utilizado en todas las reacciones de PCR es el siguiente. Para desnaturalizar el DNA se comenzó con un ciclo de 94°C por 5 minutos. El paso de amplificación fue de 37 ciclos, cada uno compuesto por tres fases: primero, 94°C por 30 segundos, luego, 58°C por 40 segundos y tercero, 72°C por 30 segundos por kilobase a amplificar más 10 segundos. Se finalizó con un ciclo de 72°C por 10 minutos para completar la elongación de los fragmentos. Para cada una de las diferentes reacciones de PCR realizadas se ocuparon los partidores que se especifican en la Tabla 3.

Para determinar la presencia y tamaño del amplificado se utilizó agarosa grado analítico (SeaKem®, Lonza) en geles de 1% p/v en TAE 1X (Tris-base pH 8 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA pH 8 1mM). 5 µL de cada producto de PCR fue mezclada con 1 µL de solución de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v, ficol 30% p/v). Esto fue sometido a electroforesis a 90 V por 45 minutos. Luego, el gel se incubó en bromuro de etidio 0,2% p/v por 20 minutos y se observaron los productos en el transiluminador SYNGENE modelo SYDR/2082. Adicionalmente en todos los geles se usó 250 ng del marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 Kb (Fermentas).

Para genotipificar el material biológico, se realizó reacciones de PCR que contenían la siguiente mezcla: solución tampón 1X con MgCl<sub>2</sub>, 1 U Paq5000™ DNA polimerasa (Stratagene), 0,2 mM dNTPs cada uno y 0,2 µM de cada partidor. Además, como templado se utilizó DNA genómico de una planta de *Arabidopsis thaliana* o una suspensión de células provenientes de una colonia de *Escherichia coli*, *Agrobacterium*

*tumefaciens* o *Saccharomyces cerevisiae* resistente a la acción de los antibióticos de selección correspondientes. Los partidores ocupados en la genotipificación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* y los de las colonias de microorganismos son detallados en la Tabla 3, sección a y b, respectivamente.

### 3.2.3.- Extracción de RNA desde *Arabidopsis thaliana* y síntesis de cDNA.

Entre 50 a 100 mg de tejido de hojas de roseta de plantas silvestres de 1 mes de edad fue utilizado para extraer RNA mediante el kit de extracción de RNA Invitrap® (Invitex); el producto fue almacenado a -80°C. Para el manejo del RNA, se utilizó agua estéril pretratada con 0,1% v/v DiEtilPiroCarbonato (DEPC) en todas las etapas de manipulación. La integridad del RNA aislado fue analizada mediante un gel de agarosa 1,5% p/v, sometiendo 1,5 µL de RNA a electroforesis a 70 V por 45 minutos y posteriormente fue revelado. Tanto la concentración de RNA como la evaluación de la contaminación con proteínas y especies fenólicas fue determinado por métodos espectrofotométricos.

Dos µg de RNA fueron tratados con 1 U de DNAasa I (Fermentas) en una solución tampón de la DNAasa I 1X con MgCl<sub>2</sub> y 20 U del inhibidor de la RNAasa RiboLock™ (Fermentas). Fue incubado a 37°C por 30 minutos y para finalizar la reacción se le agregó EDTA 50 mM. Se dividió el contenido en dos tubos a los cuales se les añadió 0,5 µg del partidor OligoAP y se incubaron a 70°C por 5 minutos. Inmediatamente después, se incubó en hielo por 5 minutos donde se les agregó la siguiente mezcla: solución tampón de la transcriptasa reversa Improm-II™ 1X, MgCl<sub>2</sub> 3

mM, dNTPs 0,5 mM cada uno y 20 U del inhibidor de RNAasa RiboLock™. Por último, a un tubo se le agregó la enzima transcriptasa reversa ImProm-II™ (Promega) y el otro se dejó como control agregándosele agua; volumen final de 20 µL. Se procedió con el siguiente protocolo de RT-PCR: 25°C por 5 minutos, luego 42°C por 60 minutos y finalmente 70°C por 15 minutos. El cDNA total resultante y su control negativo se guardaron a -20°C para su posterior uso.

#### 3.2.4.- Semicuantificación de los niveles de transcritos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.

Se amplificó los transcritos de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* desde cDNA proveniente de 1 µg de RNA de plantas silvestres de 1 mes de edad utilizando PCR y variando el número de ciclos de la fase de amplificación. Se cuantificó cada reacción mediante densitometría (ImageJ), se ajustó los resultados a una curva hiperbólica y se eligió el ciclo donde la curva se comportara como exponencial: para *AtDFG10-1* el ciclo óptimo de semicuantificación fue de 32 ciclos y para *AtDFG10-2*, 28 ciclos. Para normalizar la cuantificación de los transcritos de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se utilizó el transcrito de actina, determinándose su ciclo óptimo de semicuantificación en 25 ciclos.

Para cuantificar los niveles de transcritos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* se utilizó cDNA proveniente de 1µg de RNA de plantas de estas líneas mutantes de 1 mes de edad. Se modificó el protocolo de amplificación, usándose los ciclos óptimos de semicuantificación para cada transcrito.

Se normalizó los niveles de transcrito con el transcrito de actina y se relativizó la cuantificación normalizada comparándolas con el transcrito de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* normalizado de las plantas silvestres.

### 3.2.5.- Amplificación fidedigna de los marcos de lectura abiertos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* y su purificación.

Para amplificar fielmente los marcos de lectura abiertos (MLA) de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se utilizó cDNA proveniente de 1 µg de RNA de plantas silvestres en conjunto con su solución tampón 1X con MgCl<sub>2</sub>, partidores que hibridan los extremos 5' y 3' de los MLA de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* 0,5 µM (Tabla 3.b), 1 U de Long PCR Enzyme mix (Fermentas) y dNTPs 0,25 mM cada uno. Los amplificados de los transcritos de los genes se extrajeron desde los geles de agarosa mediante el kit de purificación de DNA PCR Wizard® (Promega) según las indicaciones descritas por los fabricantes.

### 3.2.6.- Subclonación de los marcos de lectura abiertos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*. Purificación, recombinación y confirmación de la clonación.

Los MLA de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* fueron ligados al vector de clonación pCR8® (Invitrogen) según las indicaciones descritas por los fabricantes. Para la purificación de los vectores plasmidiales, primero se creció las cepas de *Escherichia coli* transformantes en las que se detectó la presencia del vector mediante genotipificación por PCR y luego se procedió a extraer los vectores con el kit de

purificación plasmidial AxyPrep™ (Axygen) según las indicaciones descritas por los fabricantes.

Los vectores de clonación pCR8® que poseen subclonado los MLA de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se recombinaron con vectores de expresión constitutiva en levaduras y plantas (serie pAG426GPD y serie pGWB, respectivamente). La clonación se realizó mediante recombinación con la enzima LR clonasa™ II (Invitrogen) según las indicaciones descritas por los fabricantes. Se detallan las características de los plasmidios obtenidos que contienen los MLA de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* y los vectores sin recombinar en la Tabla 3.

Para corroborar la identidad de los vectores purificados se les realizó una digestión enzimática utilizando enzimas de restricción. En las digestiones simples se utilizó una cantidad de DNA plasmidial apropiada y las recomendaciones del fabricante (Fermentas). Para las digestiones con dos enzimas de restricción a la vez, se siguió la recomendación sugerida de la plataforma *online Double Digest* (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest>). Para ambos tipos de digestiones se incubó a 37°C por 16 horas.

### **3.3.- Análisis de proteínas.**

#### **3.3.1.- Detección de la proteína CPY madura y sus isoformas en los extractos proteicos de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Para extraer las proteínas totales de las cepas de *Saccharomyces* transformantes, se creció un cultivo en medio YMM durante 2 días y agitación constante. La cepa *dfg10Δ* y su parental silvestre se creció en medio YMM suplementado con uracilo.

Luego, se centrifugó a 3000 x g descartándose el sobrenadante. Luego, se resuspendió en agua destilada y se le agregó NaOH 0,1 M. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente centrifugándose posteriormente a 3000 x g.

Se resuspendió el sedimento en una solución de extracción Laemmli 2X (SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, 2-mercaptoetanol 10% v/v, azul de bromofenol 0,004% p/v y Tris HCl 0,125 M). Se incubó por 10 minutos a 95°C y se resuspendió por 30 s en vórtex. Por último, se centrifugó por 1 minuto a 14000 x g y se almacenó a -20°C. Este extracto total de proteínas de *Saccharomyces* fue mezclado con una solución de carga 4X que contenía Tris pH 6,8 200 mM, glicerol 40% v/v, SDS 8% p/v, azul de bromofenol 0,04% p/v y 2-mercaptoetanol 4% v/v. Se incubó a 95°C por 5 minutos y se homogenizó en vórtex. Luego, se cargó en geles de poliacrilamida desnaturantes (fase separadora, acrilamida 12% p/v, fase concentradora, acrilamida 5% p/v; Winkler) montadas en cámaras de electroforesis vertical (BIO-RAD). Los geles fueron sometidos a 70 V por 30 minutos y luego a 100 V por 150 minutos.

Para teñir las proteínas de los geles de poliacrilamida con Azul de Coomasie, se preparó una solución de Azul de Coomasie 0,1% p/v, metanol 50% v/v y ácido acético glacial 10% v/v y se incubaron los geles en esta solución en constante agitación por 120 minutos. Los geles se destiñeron con una solución de metanol 40% v/v y ácido acético glacial 10% v/v por al menos 2 horas, cambiando la solución varias veces hasta que el fondo del gel se hubiera destañado. Los geles fueron secados entre hojas de celulosa para posteriormente ser almacenados y fotografiados.



**Tabla 3 - Vectores utilizados.** Se detalla el tipo de plasmidio, el MLA subclonado de *A. thaliana* y el promotor que comanda su expresión, el marcador de fusión para la identificación de la proteína y la resistencia que le confiere al organismo transformado. Todos los vectores en esta lista incorporan la tecnología Gateway®.

Nombre	Tipo	Promotor	MLA Subclonado	Marcador de fusión para la identificación proteica	Selección asociada	Organismo donde se evaluó la selección
pCR8	Clonación	--	--	--	Espectinomicona	<i>Escherichia coli</i>
pCR8- <i>AtDFG10-1c</i>	Clonación	--	<i>AtDFG10-1c</i>	--	Espectinomicona	<i>Escherichia coli</i>
pCR8- <i>AtDFG10-2c</i>	Clonación	--	<i>AtDFG10-2c</i>	--	Espectinomicona	<i>Escherichia coli</i>
pAG426GPD-HA	Expresión constitutiva en levaduras	GPD	--	Hematoaglutinina	Ampicilina, cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>
					URA+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pAG426GPD-eGFP	Expresión constitutiva en levaduras	GPD	--	Proteína fluorescente verde	Ampicilina, cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>
					URA+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -HA	Expresión constitutiva en levaduras	GPD	<i>AtDFG10-1c</i>	Hematoaglutinina	Ampicilina	<i>Escherichia coli</i>
					URA+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c</i> -eGFP	Expresión constitutiva en levaduras	GPD	<i>AtDFG10-1c</i>	Proteína fluorescente verde	Ampicilina	<i>Escherichia coli</i>
					URA+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -HA	Expresión constitutiva en levaduras	GPD	<i>AtDFG10-2c</i>	Hematoaglutinina	Ampicilina	<i>Escherichia coli</i>
					URA+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c</i> -eGFP	Expresión constitutiva en levaduras	GPD	<i>AtDFG10-2c</i>	Proteína fluorescente verde	Ampicilina	<i>Escherichia coli</i>
					URA+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pGWB5	Expresión constitutiva en plantas	35S	--	Proteína fluorescente verde	Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>
					Kanamicina Higromicina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
pGWB8	Expresión constitutiva en plantas	35S	--	Histidina (x6)	Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>
					Kanamicina Higromicina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
pGWB5- <i>AtDFG10-1c</i>	Expresión constitutiva en plantas	35S	<i>AtDFG10-1c</i>	Proteína fluorescente verde	Kanamicina Higromicina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
pGWB8- <i>AtDFG10-1c</i>	Expresión constitutiva en plantas	35S	<i>AtDFG10-1c</i>	Histidina (x6)	Kanamicina Higromicina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
pGWB5- <i>AtDFG10-2c</i>	Expresión constitutiva en plantas	35S	<i>AtDFG10-2c</i>	Proteína fluorescente verde	Kanamicina Higromicina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
pGWB8- <i>AtDFG10-2c</i>	Expresión constitutiva en plantas	35S	<i>AtDFG10-2c</i>	Histidina (x6)	Kanamicina Higromicina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>

Para detectar las isoformas de CPY presentes en los extractos totales de proteínas de las distintas cepas analizadas de *Saccharomyces*, se realizó *Immunoblot*. Se transfirió las proteínas desde un gel a una membrana de nitrocelulosa por medio de electroforesis en seco a 15 V por 15 minutos (BIO-RAD). Se corroboró la transferencia a la membrana mediante su incubación con Rojo de Ponceau 0,2% p/v en ácido tricloroacético 3% v/v y ácido sulfosalicílico 3% p/p. Luego, la membrana se lavó con agua destilada y se bloqueó en solución de bloqueo (leche descremada 5% p/v en solución TBS-T) por 90 minutos a temperatura ambiente. La solución TBS-T contenía Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M y Tween-20® 0,05% v/v. Luego, se lavó la membrana por 5 minutos y se incubó con un anticuerpo monoclonal IgG contra CPY de *Saccharomyces cerevisiae* 1:5000 (Invitrogen, producido en ratón) en solución de bloqueo por 90 minutos. Luego se lavó la membrana con TBS-T en constante agitación por 10 minutos tres veces y se incubó posteriormente con un anticuerpo contra IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa 1:5000 (KPL, producido en cabra) en solución de bloqueo, lavándose posteriormente la membrana con TBS-T en constante agitación por 10 minutos y tres veces. Luego, la membrana se reveló utilizando SuperSignal® (1:1 Luminol : Peróxido; Thermo Scientific) en oscuridad y se capturó la quimioluminiscencia con una placa fotográfica.

### 3.3.2.- Detección de la proteína CPY en el medio extracelular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tanto la parental silvestre, la mutante *dfg10Δ* y las diferentes cepas mutantes *dfg10Δ* transformantes se dejaron crecer por dos días en medio YMM. Luego en una placa de 96 pocillos, se dividió los cultivos

incubándose con medio YMM que contuvo Sortin2 a una concentración final del compuesto de 0, 1, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  en 1% v/v DMSO por 72 horas (Zouhar J. & cols., 2004).

Se detectó la proteína CPY en el sobrenadante del cultivo mediante *Immunodotblot* (Zouhar J. & cols., 2004). Los medios de cultivo de cada condición fueron traspasados a una membrana de nitrocelulosa mediante filtración al vacío (Bio-dot, BIO-RAD). En el interior de la cámara se dispuso la membrana de nitrocelulosa ambientada en TBS-T. Posteriormente, la membrana se incubó en solución de bloqueo por 2 horas en agitación, para luego ser lavada con TBS-T por 5 minutos, dos veces. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal IgG contra CPY de *Saccharomyces cerevisiae* en una dilución 1:5000 (Invitrogen, producido en ratón) en solución de bloqueo por 120 minutos, lavándose después con TBS-T por 5 minutos en agitación, dos veces. Se incubó después con un anticuerpo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina en una dilución 1:5000 (Reserve Ap<sup>TM</sup>, KPL; producido en cabra) en solución de bloqueo por 120 minutos y en oscuridad. Se lavó la membrana con TBS-T por 10 minutos en constante agitación, dos veces.

Se incubó la membrana con una solución que contenía Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$  en oscuridad hasta que apareciera un precipitado violeta en la membrana. Se detuvo la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina sumergiendo la membrana en una solución EDTA 10 mM.

### 3.3.3.- Localización subcelular de los productos de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los cultivos en fase exponencial tardía de las diferentes cepas *dfg10Δ* de levaduras transformadas con los vectores que permiten la expresión de la proteína de fusión fluorescente fueron crecidos en medio YMM. Luego, se incubó en FM4-64 48  $\mu$ M final en YMM por 30 minutos en hielo y en oscuridad. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en medio YPD fresco y se incubó en un baño seco a 28°C. Una alícuota de la suspensión se montó en un portaobjeto tratado con Concanavalina A 1 mM y se cubrió con un cubreobjeto. Las imágenes que registraron tanto la fluorescencia de la proteína fluorescente verde y FM4-64 como el campo claro, se tomó simultáneamente por microscopía confocal a 25 y 40 minutos después del inicio de la incubación en el baño seco.

#### **3.4.- Obtención y análisis de datos.**

Para el análisis del fenotipo de las líneas mutantes y las líneas mutantes complementadas, se tomaron fotografías a los 14 días después de su siembra. Se contó el número de raíces laterales emergidas con un microscopio óptico con un aumento de 40X (Nikon). Para las fotografías se utilizó una cámara comercial Fujifilm modelo FINEPIX S1500 con un objetivo de 12X. Se ocupó la luz blanca del transiluminador DESAGA D-6900 como fondo. Para la cuantificación de la longitud de la raíz primaria como también el número de raíces laterales emergidas y el ángulo que forma la raíz primaria en los tratamientos con Sortin2 y Tunicamicina, fueron utilizados los programas computacionales tpsDIG2 2.15 (James Rohlf, Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook; <http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>) e ImageJ 1.38x (Wayne Rasband, NIH, USA). En la cuantificación de la curvatura de la raíz primaria, los resultados fueron tabulados en 12 intervalos de 30° cada uno: (345° - 15°), (15° - 45°), (45° - 75°), (75° -

105°), (105° - 135°), (135° - 165°), (165° - 195°), (195° - 225°), (225° - 255°), (255° - 285°), (285° - 315°) y (315° - 345°). Para determinar el valor IRGA, las frecuencias de los intervalos fueron ponderados por el valor 0 al intervalo (75° - 105°); por el valor 1 a los intervalos (45° - 75°) y (105° - 135°); por el valor 2 a los intervalos (45° - 75°) y (165° - 195°); por el valor 3 a los intervalos (15° - 45°) y (165° - 195°); por el valor 4 a los intervalos (195° - 225°) y (345° - 15°). Por los valores 5, 6, 7 y 8 se ponderaron a los intervalos (225° - 255°), (255° - 285°), (285° - 315°) y (315° - 345°), respectivamente. Se sumaron los valores y se calculó el promedio IRGA.

Estos datos fueron graficados, analizados estadísticamente y contrastados mediante el programa computacional Graphpad Prism 5.0®. Las pruebas estadísticas ocupadas para contrastar las diferencias entre las distintas plantas mutantes silvestres fueron las siguientes: ANOVA de una vía con posterior prueba post – ANOVA de Tukey, prueba t de Student de dos colas, prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, prueba de  $\chi^2$  y prueba exacta de Fisher. Para todas las pruebas estadísticas, se consideró una diferencia entre dos grupos analizados con un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativa.

#### 3.4.1.- Microscopía confocal.

El microscopio confocal utilizado fue Zeiss LSM 510. Para recoger la fluorescencia de FM4-64, se excitó con un láser a 543 nm y se capturó la fluorescencia emitida con un filtro que rescata longitudes de onda mayores a los 560 nm. Para recoger la fluorescencia de la proteína fluorescente verde, se excitó con un láser a los 488 nm, capturándose la fluorescencia emitida con un filtro que rescata las longitudes de onda comprendidas entre los 505 nm y 530 nm.

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- Estudio de la función molecular de los genes *AtDFG10s*.

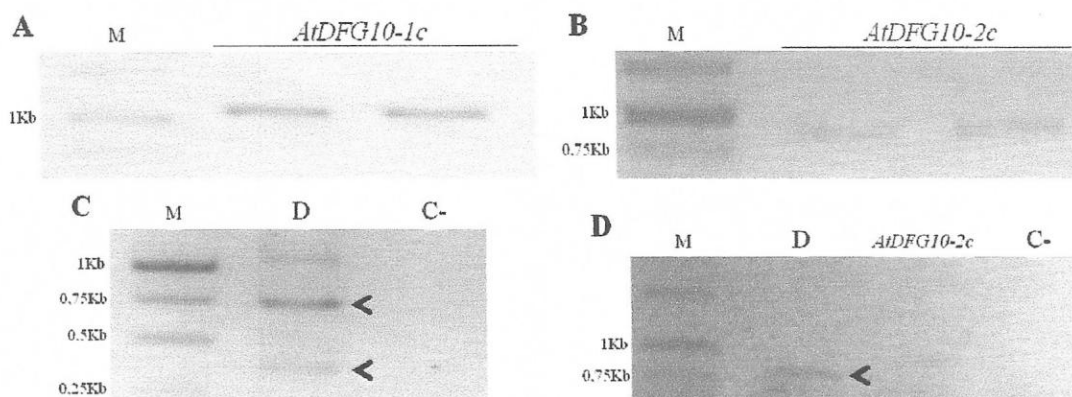
#### 4.1.1.- Amplificación de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, subclonación en vectores de clonación y control de calidad de los vectores generados.

La cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* con la delección del gen *ScDFG10*, *dfg10Δ*, es resistente al efecto celular de Sortin2. Determinamos mediante una búsqueda bioinformática que tres genes de *Arabidopsis* son posibles ortólogos al gen *ScDFG10* de *Saccharomyces*, denominados *AtDFG10-1*, -2 y -3 (Rubilar, C. 2010). Con el objetivo de estudiar la función de los genes *AtDFG10s*, una de las estrategias ideadas fue evaluar la complementación del fenotipo de la cepa mutante *dfg10Δ* al expresar estos genes y de esa manera estudiar si los *AtDFG10s* comparten la función de *ScDFG10*.

Para cumplir este objetivo, lo primero que se realizó fue obtener los amplificadores de los marcos de lectura abiertos de los genes *AtDFG10s* de manera específica y fiel desde cDNA proveniente de una hoja de roseta madura de una planta silvestre de *A. thaliana* (Col-0). Como se fusionarán secuencias que codifican para marcadores de detección de la proteína en el extremo 3' de los amplificadores, se utilizó partidores específicos que eliminan el codón de término de los marcos de lectura abiertos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.

En la Figura 2 se muestra la obtención y la posterior corroboración del amplificado de los marcos de lectura abierta de *AtDFG10-1* (*AtDFG10-1c*, Figura 2A), y de *AtDFG10-2* (*AtDFG10-2c*, Figura 2B). Específicamente, se observó en A una banda con un tamaño levemente superior a 1000 pb y en B se detectó una banda que migra entre 750 pb y 1000 pb. Ambos tamaños de los productos de la amplificación obtenidos corresponden a lo esperado (Tabla 4). Se corroboró la identidad de los amplificados obtenidos mediante digestión enzimática de *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* (Tabla 4). En la Figura 2C, se muestra que la digestión enzimática de *AtDFG10-1c* dio como producto tres bandas. La banda superior posee un tamaño similar al tamaño de *AtDFG10-1c* sin digerir, lo cual se sugiere que la digestión fue parcial. Las bandas de menor peso molecular poseen un tamaño levemente menor a 750pb y entre 250 y 500 pb, que corresponden a lo esperado para la digestión de *AtDFG10-1c* (Tabla 4). En la Figura 2D, se observa que, de la digestión enzimática de *AtDFG10-2c*, se obtuvo un producto ligeramente superior a 750pb, tamaño esperado para el producto de mayor peso molecular de la digestión a *AtDFG10-2c* (Tabla 4) y de mayor migración electroforética que *AtDFG10-2c* sin digerir. El otro producto de la digestión no se pudo detectar, probablemente debido a su pequeño tamaño (101pb). Por lo tanto, los amplificados obtenidos son muy probablemente *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*.

El marco de lectura abierto de *AtDFG10-3* no se pudo amplificar por PCR a pesar de utilizar cDNA proveniente de diversas fuentes como hoja de roseta de 1 mes de edad y plántula completa de 7 días de edad (resultados no mostrados).



**Figura 2 – Amplificación y corroboración de la identidad de los marcos de lectura abierto de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.** A-B. Se observa la amplificación del marco de lectura abierto de *AtDFG10-1* (*AtDFG10-1c*; A) y *AtDFG10-2* (*AtDFG10-2c*; B) desde cDNA de hoja de *Arabidopsis thaliana* (Col-0). C-D. Se muestra el resultado de las digestiones enzimáticas de *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* con HindIII (C) y SspI (D), respectivamente. El carril D indica la digestión de cada amplificado. Las puntas de flechas indican el producto obtenido de la digestión. M, marcador de peso molecular; C-, digestión sin DNA.

**Tabla 4 – Tamaños esperados de la amplificación de los marcos de lectura abiertos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* y sus patrones de digestión.**

Marco de lectura abierta	Tamaño de fragmentos (bp)		
<i>AtDFG10-1c</i>	Fragmento completo	1084	
	Digestión con HindIII	727	357
<i>AtDFG10-2c</i>	Fragmento completo	863	
	Digestión con SspI	762	101

Se muestran los tamaños de *AtDFG10-1c*, *AtDFG10-2c* y los tamaños de los fragmentos resultantes de la digestión enzimática realizada por las endonucleasas HindIII y SspI, respectivamente.

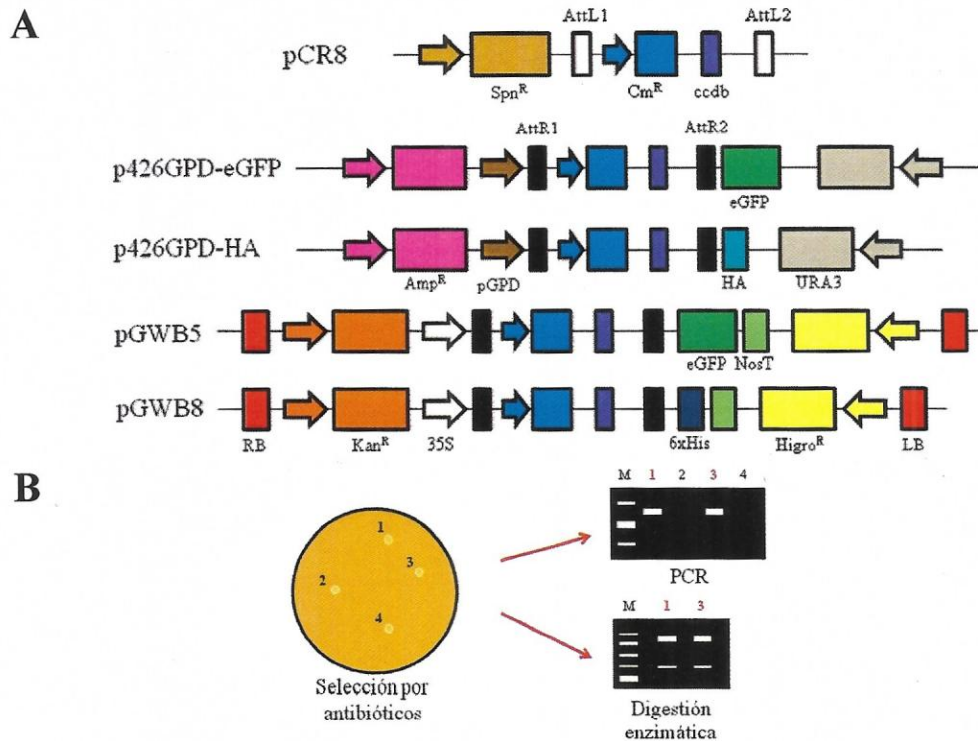
Con el objeto de subclonar *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*, estos fueron purificados desde geles de agarosa y ligados al vector de clonación pCR8®, generando los vectores pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c*, respectivamente. El vector de clonación pCR8® fue escogido, ya que transfiere en un solo paso la secuencia subclonada mediante recombinación sitio-específica (Gateway) a vectores de expresión, los cuales



presentan promotores que comandan la expresión constitutiva de su secuencia subclonada en *Saccharomyces cerevisiae* o *Arabidopsis thaliana* dependiendo del vector de expresión en cuestión (Figura 3). Sin embargo, la secuencia subclonada puede posicionarse en la dirección inversa a la correcta, por lo que es necesario corroborar la correcta dirección de la secuencia subclonada en los diferentes vectores utilizados en este trabajo, tanto de clonación como de expresión. Para corroborarlo, primero se seleccionó las colonias transformadas resistentes a un antibiótico dependiendo del factor de resistencia codificado dentro del vector; se confirmó las colonias que presentan el plasmidio con la secuencia subclonada en la dirección correcta tanto por PCR como también por la evaluación del patrón de digestión, producto de la digestión enzimática al vector purificado de la colonia seleccionada por PCR (Figura 3). Para realizar la digestión enzimática de cada vector, se seleccionó endonucleasas que poseen un sitio de corte dentro de la secuencia subclonada o zona de recombinación y uno o más sitios de corte por fuera de la zona de recombinación del vector a evaluar. Se evaluó el patrón de digestión del vector digerido contrastándolo con el tamaño de los fragmentos esperados que son especificados en diferentes tablas dentro de este trabajo.

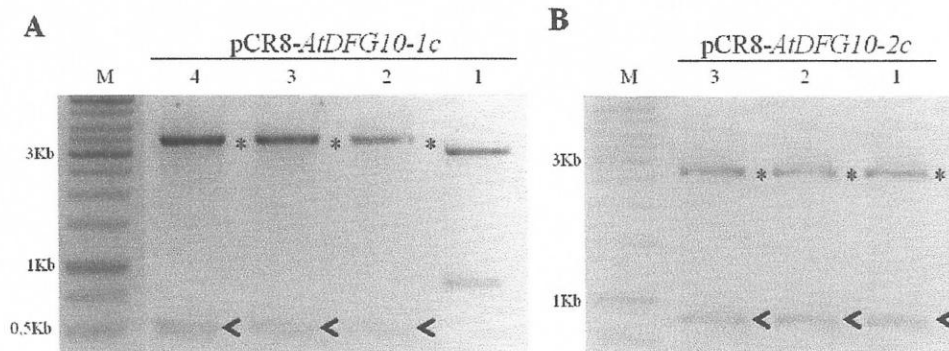
Entonces, para corroborar que los amplificadores *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* obtenidos se hayan ligado en sentido correcto con respecto a los sitios de recombinación de pCR8®, se les realizó una digestión enzimática cuyo patrón de digestión se observa en la Figura 4. En la sección A se aprecia que los vectores pCR8-*AtDFG10-1c* provenientes de tres clones distintos (2, 3, 4) presentan bandas de alrededor de 3500pb y 500 pb, un patrón de digestión esperado para la configuración sentido (Tabla 5). En contraste, el proveniente del clon 1, se observa solo dos bandas, una de alrededor de

3000pb y otra superior a 750pb, patrón coincidente para la digestión de pCR8-*AtDFG10-1c* en anti-sentido (Tabla 5). En la sección B de la Figura 4, se observa que los vectores pCR8-*AtDFG10-2c* provenientes de las tres colonias utilizadas presentan el patrón de digestión correspondiente a pCR8-*AtDFG10-2c* en configuración sentido, una banda entre 2500 a 3000 pb y la otra entre los 750 a 1000 pb (Tabla 5). Por lo tanto, se obtuvo los vectores de clonación deseados, los cuales poseen los amplificadores en la configuración necesaria con respecto a los sitios de recombinación de pCR8®.



**Figura 3 – Vectores de clonación y de expresión utilizados y la estrategia de la corroboración de la presencia y dirección del marco de lectura abierto subclonado en ellos. A.** Se esquematiza los vectores utilizados en este trabajo, el vector de clonación pCR8 y los vectores de expresión en levaduras (serie p426GPD) y en plantas (serie pGWB). En flechas se muestra las regiones promotoras y en cajas, las regiones no promotoras más importantes que poseen estos vectores. Todos los vectores utilizados antes de ser recombinados poseen sitios de recombinación (cajas blancas – AttL - y negras – AttR) que flanquean una región llamada de recombinación que contiene el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm<sup>R</sup>, azul claro) y un marcador de selección negativa de bacterias (ccdb, púrpura). El vector de clonación pCR8 posee el

gen de resistencia a espectinomicina ( $\text{Spn}^R$ , café claro) por fuera de la región de recombinación. Los vectores de la serie p426GPD contienen el gen de resistencia a ampicilina ( $\text{Amp}^R$ , rosado), el gen que restituye la prototrofia a uracilo ( $\text{URA3}$ , gris) y río arriba de la región de recombinación se ubica el promotor de la Glicerol Fosfato Deshidrogenasa (pGPD, café oscura). Además, el vector p426GPD-eGFP contiene río abajo de la región de recombinación el marco de lectura abierta de la proteína fluorescente verde (eGFP, caja verde) y p426GPD-HA, una secuencia que codifica para un epítipo de la Hematoaglutinina (HA, caja celeste). Los vectores binarios de la serie pGWB poseen los sitios que delimitan al fragmento de transferencia, T-DNA (RB, LB, rojo), el gen de resistencia a kanamicina ( $\text{Kan}^R$ , anaranjado) y a higromicina ( $\text{Higro}^R$ , amarillo) y río arriba de la región de recombinación se ubica el promotor del ARNr 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S, flecha blanca). Además, el vector pGWB5 contiene río abajo de la región de recombinación el marco de lectura abierta de la proteína fluorescente verde en conjunto con la secuencia terminadora de nopalina sintasa (NosT, verde claro) y p426GPD-HA, una secuencia que codifica para un epítipo de hexa-histidina (HA, azul oscuro). **B.** Se muestra la estrategia de la corroboración de la presencia y la dirección del marco de lectura abierto subclonado los vectores de clonación y de expresión descritos en A. Las colonias de *Escherichia coli* resistentes al antibiótico de selección (que depende de cada vector utilizado) son analizadas mediante PCR para detectar la presencia de la secuencia subclonada. Las colonias positivas (colonia 1 y 3, números en negritas y rojas) son crecidas y su vector es purificado para la evaluación de su patrón de digestión mediado por endonucleasas previamente elegidas dependiendo del vector a analizar.



**Figura 4 – Corroboración de la clonación de los marcos de lectura abierta de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en el vector de clonación pCR8®.** A. Se muestra los patrones de digestión de los vectores pCR8-*AtDFG10-1c* utilizando HindIII en conjunto con EcoRV. B. Se muestra los patrones de digestión de los vectores pCR8-*AtDFG10-2c* usando a EcoRV en conjunto con SspI. Diferentes colonias de *Escherichia coli* transformadas con el vector correspondiente fueron evaluadas, las cuales se identifican por los números sobre cada carril. Los asteriscos y las puntas de flecha indican el producto de mayor y menor tamaño, respectivamente, en las digestiones de los vectores que poseen la secuencia subclonada en sentido con respecto a los sitios de recombinación. M, marcador de peso molecular.

**Tabla 5 – Patrones de digestión esperados de los vectores pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c*.**

Vector	Endonucleasas ocupadas	Configuración del amplificado subclonado	Tamaño de fragmentos esperados (bp)	
pCR8- <i>AtDFG10-1c</i>	HindIII+ EcoRV	Sentido	3418	480
	HindIII+ EcoRV	Antisentido	3046	852
pCR8- <i>AtDFG10-2c</i>	EcoRV+SspI	Sentido	2792	887
	EcoRV+SspI	Antisentido	3453	226

Se indican los tamaños esperados de los productos de las digestiones de los vectores pCR8 que poseen subclonado *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* tanto en configuración sentido como en antisentido con respecto a los sitios de recombinación de pCR8.

Los amplificados de los marcos de lectura abiertos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* pueden presentar mutaciones que afecten finalmente la actividad proteica de su producto y por ende su funcionalidad. Esta probabilidad se minimizó utilizando una polimerasa con una actividad correctora de la polimerización. Sin embargo, para corroborar que no existan mutaciones en los marcos de lectura abiertos subclonados en pCR8, se procedió a secuenciar las construcciones pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c*. En la Tabla 6 se muestra la evaluación de la secuenciación realizada en la zona de recombinación de los vectores de clonación purificados que poseían la configuración sentido. Al comparar la secuencia codificante clonada de pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c* con la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), se encontró que hay un 100% de identidad nucleotídica para ambos amplificados clonados. También, se corroboró las mutaciones sitio-dirigidas en los codones de término de ambas secuencias clonadas: en pCR8-*AtDFG10-1c* el codón de término “TAA” fue reemplazado por el codón “TCG” que codifica para un residuo de Serina; en pCR8-*AtDFG10-2c* se cambió su codón de

término “TAG” por el codón “CAG”, el cual codifica para un residuo de Glutamina. Los nuevos codones se eligieron porque codifican para aminoácidos que presentan características fisicoquímicas similares a los residuos aminoacídicos vecinos. Con ello se espera minimizar algún efecto adverso en alguna característica de la proteína en cuestión debido a la adición de un nuevo residuo. Además, se observó que las secuencias aledañas al sitio de clonación en pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c* no poseen diferencias nucleotídicas con respecto a la secuencia del vector PCR8® informado por el proveedor. También, se corroboró la configuración en sentido de la secuencia amplificada clonada en los vectores analizados. En resumen, podemos concluir que los vectores pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c* poseen la calidad suficiente para ser utilizados en eventos de recombinación con vectores de expresión en distintos organismos.

**Tabla 6 – Verificación de la fidelidad de *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* subclonados en los vectores de clonación pCR8.**

Parámetros analizados	pCR8- <i>AtDFG10-1c</i>	pCR8- <i>AtDFG10-2c</i>
Porcentaje de identidad de secuencia con respecto a la base de datos.	100	100
Codón de término de la secuencia clonada.	Reemplazado por TCG (S)	Reemplazado por CAG (Q)
Estado de secuencias del vector en los sitios de recombinación	Sin mutaciones	Sin mutaciones

Se resume los diferentes parámetros analizados en la secuenciación de la zona entre los sitios de recombinación de los vectores pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c*. Se utilizó la base de datos TAIR para comparar a *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*.

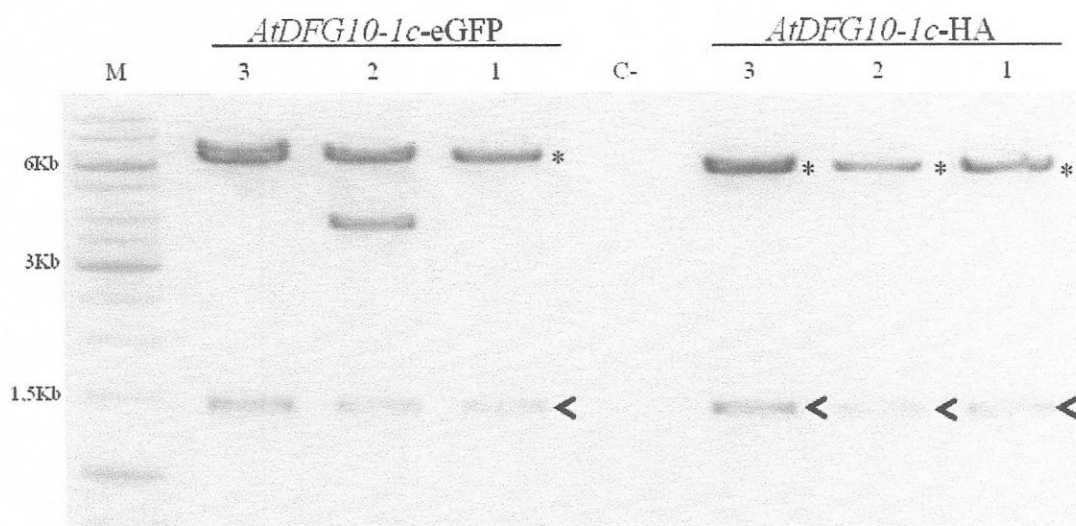
4.1.2.- Obtención de las cepas *dfg10Δ* transformadas con los vectores de expresión en levaduras que poseen subclonado *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*.

Los vectores pCR8-*AtDFG10-1c* y pCR8-*AtDFG10-2c* fueron recombinados con dos vectores de expresión en levaduras. Estos corresponden a los de la serie p426GPD que poseen el promotor de la Glicerol Fosfato Deshidrogenasa (GPD, siglas en inglés) de expresión constitutiva en levaduras. Los dos vectores utilizados son p426GPD-HA y p426GPD-eGFP. El vector p426GPD-HA posee una secuencia que codifica para un epítipo perteneciente a la Hematoaglutinina (HA) y p426GPD-eGFP posee la secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde (eGFP). Ambas secuencias permiten etiquetar las proteínas de interés en el extremo C-terminal. Producto de la recombinación se obtuvieron cuatro nuevos vectores que permiten expresar en levaduras los genes *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*: p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA y p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP; p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA y p426GPD-*AtDFG10-2c*-eGFP.

Para corroborar que los vectores generados contengan la secuencia clonada y en configuración sentido con respecto al promotor GPD, se digirió los cuatro vectores purificados. En la Figura 5 se muestra el patrón de digestión obtenido para los vectores de expresión de levaduras que contienen a *AtDFG10-1c*, purificados de diferentes clones. Se observa que el vector p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA proveniente de tres clones distintos, presentan bandas de tamaños de alrededor a 6000pb y un poco inferior a 1500pb, el cual coincide con el patrón esperado al poseer *AtDFG10-1c* en configuración sentido con respecto a su promotor (Figura 5, Tabla 7). Con respecto al patrón de digestión de p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP, se observa diferentes situaciones. Se identificó dos bandas como productos de la digestión provenientes de los vectores

purificados desde el clon 1 y 3, cuyos tamaños son superior a los 6000pb y ligeramente inferior a 1500pb. Este patrón corresponde a lo esperado para p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP cuando *AtDFG10-1c* se encuentra en dirección sentido con respecto a su promotor (Figura 5, Tabla 7). No se observa la tercera banda esperada, probablemente debido a su pequeño tamaño. El patrón de digestión del vector del clon 2, además de las dos bandas descritas anteriormente, posee una banda de alrededor de 4000pb que no corresponde a ningún caso esperado.

En la Figura 6 se observa los patrones de digestión obtenidos para los vectores de expresión de levaduras que contienen a *AtDFG10-2c*, utilizando la enzima de restricción NdeI. Se observa que el producto de la digestión de los vectores p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA presenta tres bandas, la mayor de un tamaño superior a 5000pb y menor a 6000pb, otra de alrededor de 2000pb; y la de menor tamaño, inferior a 500pb. Este patrón corresponde a lo esperado para el vector que posee subclonado *AtDFG10-2c* en dirección sentido con respecto a su promotor (Figura 6, Tabla 8). Por lo tanto con estos resultados, se corroboró la obtención de cuatro vectores de expresión constitutiva en levadura los cuales poseen a *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* en la configuración correcta con respecto al promotor del plasmidio.



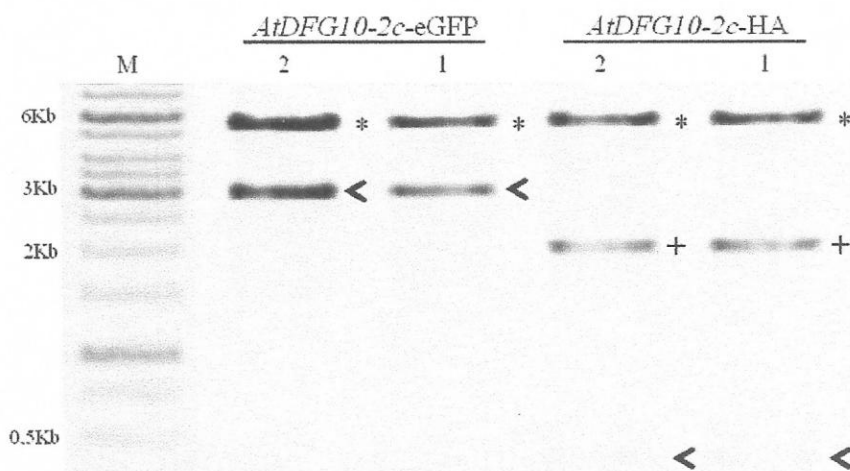
**Figura 5 – Corroboración de la subclonación de *AtDFG10-1c* en los vectores de expresión en levaduras.** Se muestra el patrón de digestión obtenido de los vectores que poseen subclonado *AtDFG10-1c* utilizando simultáneamente *SacI* y *HindIII*. Estos vectores se purificaron a partir de colonias independientes de *E. coli* identificadas con los números sobre cada carril. Los vectores poseen fusionado río abajo de *AtDFG10-1c*, el gen que codifica a la proteína fluorescente verde (*AtDFG10-1c-eGFP*) o la secuencia que codifica para un epítipo de hematoaglutinina (*AtDFG10-1c-HA*). Los asteriscos y las cabezas de flecha indican los fragmentos de mayor y menor tamaño observados en las digestiones dobles para los vectores que poseen *AtDFG10-1c* en sentido con respecto al promotor del vector. M, marcador de peso molecular; C-, digestión sin DNA.

**Tabla 7 – Patrones de digestión esperados de los vectores de expresión en levaduras que poseen subclonado el marco de lectura abierto de *AtDFG10-1*.**

Vector	Configuración de <i>AtDFG10-1c</i>	Tamaño de los fragmentos esperados (bp)		
		6613	1418	388
pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c-eGFP</i>	Sentido	6613	1418	388
	Antisentido	6613	1046	760
pAG426GPD- <i>AtDFG10-1c-HA</i>	Sentido	6004	1419	387
	Antisentido	6004	1047	759

Se indica los tamaños de los productos esperados de las digestiones enzimáticas de *SacI* en conjunto con *HindIII* para los vectores que poseen *AtDFG10-1c* en sentido como en antisentido con respecto al promotor del vector.





**Figura 6 – Corroboración de la subclonación de *AtDFG10-2c* en los vectores de expresión en levaduras.** Se muestra los patrones de digestión de los vectores p426GPD que poseen subclonado *AtDFG10-2c* utilizando la endonucleasa NdeI. Estos vectores poseen fusionado río abajo de *AtDFG10-2c*, el gen que codifica a la proteína fluorescente verde (*AtDFG10-2c-eGFP*) o la secuencia que codifica para un epítipo perteneciente a la hematoaglutinina (*AtDFG10-2c-HA*). Los vectores se purificaron a partir de diferentes colonias de *E. coli* transformadas, las cuales se identificaron con los números que aparecen sobre cada carril. Los asteriscos, el signo “+” y las cabezas de flechas indican los tamaños esperados de los productos de mayor, intermedio y menor peso de la digestión, respectivamente, para los vectores que poseen subclonado el gen en sentido a su promotor. M, marcador de peso molecular.

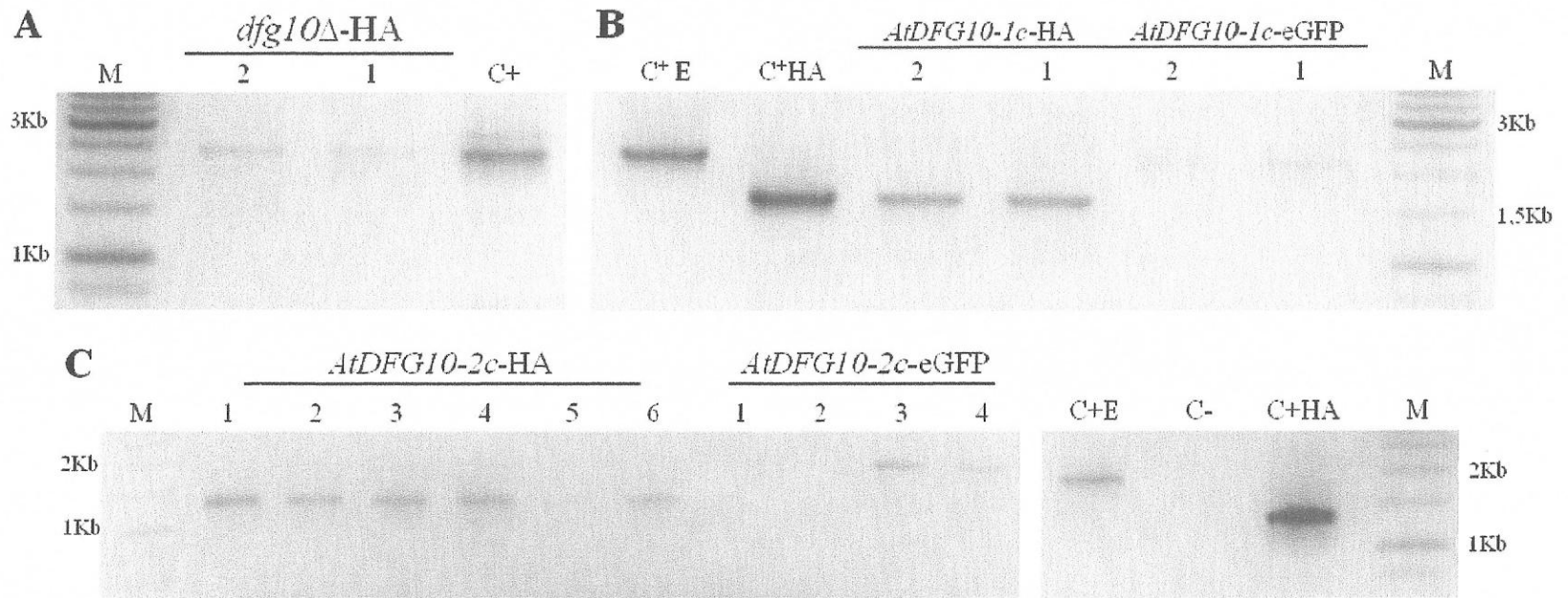
**Tabla 8 – Patrones de digestión esperados de los vectores de expresión en levaduras que poseen subclonado el marco de lectura abierto de *AtDFG10-2*.**

Vector	Configuración de <i>AtDFG10-2c</i>	Tamaño de fragmentos esperados (bp)		
pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c-eGFP</i>	Sentido	5308	2892	
	Antisentido	4837	3363	
pAG426GPD- <i>AtDFG10-2c-HA</i>	Sentido	5311	1968	312
	Antisentido	4840	1968	783

Se muestra los tamaños de los productos esperados de la digestión enzimática mediada por la endonucleasa NdeI para los vectores de expresión en levadura que poseen subclonado *AtDFG10-2c* tanto en sentido como en antisentido al promotor del vector.

Con los vectores de expresión que portan *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* y los vectores sin recombinar, se procedió a transformar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

*dfg10Δ*. La selección de las colonias transformantes se realizó por auxotrofia a uracilo en un medio mínimo de cultivo. Para corroborar la transformación con los vectores correspondientes, se realizó PCR a las colonias que crecieron en este medio mínimo, utilizando partidores específicos detectando la presencia de los *AtDFG10s* subclonados en sentido con el promotor y la región de recombinación de los vectores sin recombinar. En la Figura 7B se muestra el producto de PCR de dos colonias transformadas con p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA y dos con p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP, los cuales poseen un tamaño ligeramente superior a 1500pb y 2000pb, respectivamente. Ambos tamaños son similares a lo obtenido al amplificar utilizando los mismos partidores en los plasmidios p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA (carril C+HA) y p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP (carril C+E) purificados. En la Figura 7C se observa que los productos de PCR de seis colonias transformadas con p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA analizadas y dos con p426GPD-*AtDFG10-2c*-eGFP poseen tamaños similares al amplificado de los correspondientes vectores purificados, una banda de tamaño ligeramente inferior a 1500pb y otra de 2000pb, respectivamente (carril C+HA y carril C+E). Por su parte, en colonias transformadas con el vector sin recombinar p426GPD-HA, el producto de PCR es alrededor a 2500 pb, tamaño similar al obtenido al amplificar el vector sin recombinar p426GPD-HA purificado (carril C+) (Figura 7A). Estos resultados corroboran la obtención de cinco cepas de levaduras *dfg10Δ* que poseen los cuatro vectores de expresión en levaduras generados (p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA y p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP; p426-GPD-*AtDFG10-2c*-HA y p426GPD-*AtDFG10-2c*-eGFP) y el vector vacío p426GPD-HA para ser utilizado como control.



**Figura 7 – Corroboración de la transformación de la cepa de *Sacharomyces cerevisiae* *dfg10*Δ con los vectores p426GPD-eGFP y p426GPD-HA que poseen subclonados a *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*.** **A.** Amplificación de la región de recombinación en *dfg10*Δ transformada con el vector p426GPD-HA (*dfg10*Δ-HA). **B.** Amplificación de *AtDFG10-1c* en configuración sentido con respecto al promotor en colonias *dfg10*Δ transformadas con los vectores p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA (*AtDFG10-1c*-HA) y p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP (*AtDFG10-1c*-eGFP). **C.** Amplificación de *AtDFG10-2c* en configuración sentido con respecto a su promotor en colonias *dfg10*Δ transformadas con los vectores p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA (*AtDFG10-2c*-HA) y p426GPD-*AtDFG10-2c*-eGFP (*AtDFG10-2c*-eGFP). Se realizaron controles amplificando los vectores purificados: C+, p426GPD-HA; C+HA, p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA, p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA; C+E, p426GPD-*AtDFG10-1c*-eGFP, p426GPD-*AtDFG10-2c*-eGFP; C-, amplificación sin DNA. Los números sobre los carriles corresponden a diferentes clones provenientes de cada evento de transformación que crecieron en medio mínimo. M, marcador de peso molecular.

4.1.3.- Estudios de complementación funcional de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en la cepa mutante *dfg10Δ*.

La cepa de *S. cerevisiae dfg10Δ* es resistente a la acción del compuesto Sortin2 el cual altera la ruta de tráfico hacia la vacuola causando que proteínas vacuolares como CPY se secreten al medio extracelular (Norambuena, L. datos no publicados). Además, se ha mostrado que *dfg10Δ* presenta deficiencias en el proceso de N-glicosilación de proteínas (Cantagrel, V. & col. 2010). Con estos antecedentes se idearon dos ensayos independientes para evaluar la capacidad de complementar la función de *ScDFG10* de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*: un ensayo de sensibilidad a Sortin2 utilizando un ensayo *dot-blot* en que se detecta la proteína vacuolar CPY en el medio extracelular y, por otra parte, el análisis de la N-glicosilación de proteínas evaluando el patrón de glicosilación de la proteína CPY, el cual también es un marcador clásico de la N-glicosilación de proteínas.

En la Tabla 9 se muestra los resultados del ensayo de sensibilidad a Sortin2 realizados a las cepas parental silvestre BY4742, *dfg10Δ* y *dfg10Δ* transformada con el vector sin recombinar (*dfg10Δ*-HA) y con los vectores p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA y p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA. Cabe destacar que la sensibilidad a Sortin2 se entiende como la concentración mínima de este compuesto en la cual CPY es detectado en el medio extracelular. Se observa que en cultivos de la cepa parental, CPY es detectado en el tratamiento de 5  $\mu$ M de Sortin2, mientras que en la cepa *dfg10Δ* se requiere 20  $\mu$ M del compuesto químico para detectar esta proteína en el medio extracelular, mostrando la resistencia de esta cepa a Sortin2 (Tabla 9). La cepa mutante transformada con el vector sin recombinar registra una sensibilidad similar a la cepa mutante sin transformar,

indicando que los elementos que se encuentran en el vector de expresión no interfieren en el ensayo. Al observar el ensayo realizado a la cepa que fue transformada con p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA, se detecta CPY en el medio de cultivo a una concentración de Sortin2 5  $\mu$ M, similar a la cepa parental silvestre (Tabla 9). Es decir, se revierte el fenotipo mutante al expresar *AtDFG10-2c*. Por el contrario en la cepa transformada con p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA la sensibilidad a Sortin2 es similar a la cepa mutante (Tabla 9). Este resultado sugiere fuertemente que *AtDFG10-2* posee la misma función celular que ScDFG10.

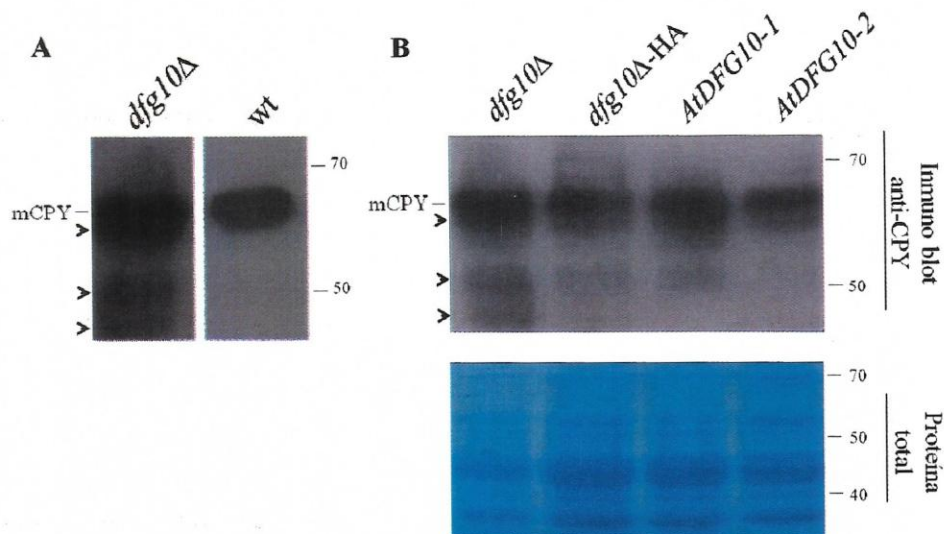
Se ha reportado que la proteína CPY madura presenta cuatro sitios N-glicosilados en la cepa silvestre (Winther, J. & col. 1991). En la Figura 8A y al igual que en Cantagrel, V. & col. (2010), se observa que *dfg10 $\Delta$*  presenta isoformas de CPY de menor peso molecular que la proteína madura, las cuales no se observan en la cepa parental silvestre. Se ha mostrado que estas isoformas corresponden a isoformas hipoglicosiladas de CPY (Cantagrel, V. & col. 2010). Para evaluar la función de *AtDFG10s* en la N-glicosilación de proteínas, se analizó el patrón de isoformas de CPY detectados por *inmuno-blot* en extractos proteicos totales de las cepas *dfg10 $\Delta$*  y *dfg10 $\Delta$*  transformadas con los vectores p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA (*AtDFG10-1*) y p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA (*AtDFG10-2*) y con el vector sin recombinar (*dfg10 $\Delta$* -HA) como control (Figura 8B). Se observa que el patrón de CPY en la cepa mutante no se altera al ser transformada con el vector sin recombinar. En cambio, al ser transformada con p426GPD-*AtDFG10-2c*-HA hay una clara desaparición de las isoformas hipoglicosiladas, revirtiendo el fenotipo mutante. Este cambio no se debe a la cantidad de proteínas en el gel como lo muestra la tinción del gel con Azul de Coomasie (Figura

8B, inferior). Por el contrario, no se observa una reversión clara en el patrón de isoformas de CPY en *dfg10Δ* transformada con el vector p426GPD-*AtDFG10-1c*-HA. Tanto el ensayo de sensibilidad a Sortin2 como el patrón de glicosilación de CPY muestran resultados que sugieren que la expresión de *AtDFG10-2c*-HA revierte el fenotipo mutante de *dfg10Δ*. Por lo tanto, se puede concluir que *AtDFG10-2* comparte la misma función celular de ScDFG10 en levaduras: cumple una función importante en la acción celular de Sortin2 y en la N-glicosilación de proteínas. Como el gen *AtDFG10-2* fue aislado de *A. thaliana* se puede extrapolar los resultados en los que *AtDFG10-2* participaría en el proceso de N-glicosilación de proteínas y en la acción de Sortin2 en este organismo.

**Tabla 9 – Ensayo de sensibilidad al efecto de Sortin2 en la secreción de la proteína vacuolar CPY.**

Cepas	Sensibilidad a Sortin2 (μM)
Parental Silvestre	5
<i>dfg10Δ</i>	20
<i>dfg10Δ</i> -HA	20
<i>dfg10Δ-AtDFG10-1c</i> -HA	20
<i>dfg10Δ-AtDFG10-2c</i> -HA	5

Se informa la sensibilidad al compuesto Sortin2 de las cepas parental silvestre, mutante *dfg10Δ* y transformantes *dfg10Δ-AtDFG10-1c*-HA, *dfg10Δ-AtDFG10-2c*-HA y *dfg10Δ*-HA. Se considera la sensibilidad a Sortin2 como la mínima concentración de este compuesto en el cual CPY es detectado en el medio extracelular. El ensayo fue realizado dos veces, observándose idénticos resultados entre ellos.

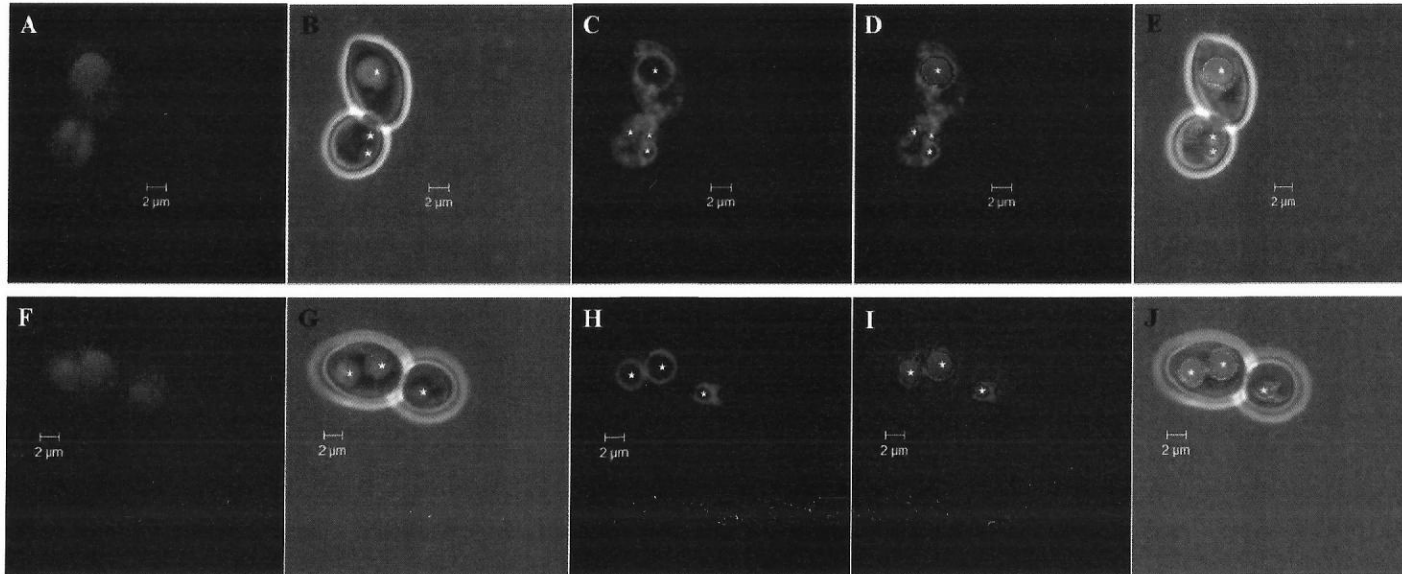


**Figura 8 – Ensayo de glicosilación de proteínas: patrón de glicosilación de CPY.** A. Se muestra la identificación de la proteína CPY madura (mCPY) y sus isoformas hipoglicosiladas (puntas de flecha) en extractos proteicos de la cepa *dfg10Δ* y la cepa parental silvestre (*wt*). B, superior. Se exhibe el patrón de isoformas de CPY (mCPY y puntas de flecha) en extractos proteicos de las cepas *dfg10Δ* y las cepas transformantes *dfg10Δ-HA*, *dfg10Δ-AtDFG10-1c-HA* (*AtDFG10-1*) y *dfg10Δ-AtDFG10-2c-HA* (*AtDFG10-2*). B, inferior. Los extractos proteicos analizados en B, superior, son visualizados con Azul de Coomassie para evaluar el control de carga y la integridad de las muestras. Los pesos moleculares indicados están expresados en KDa.

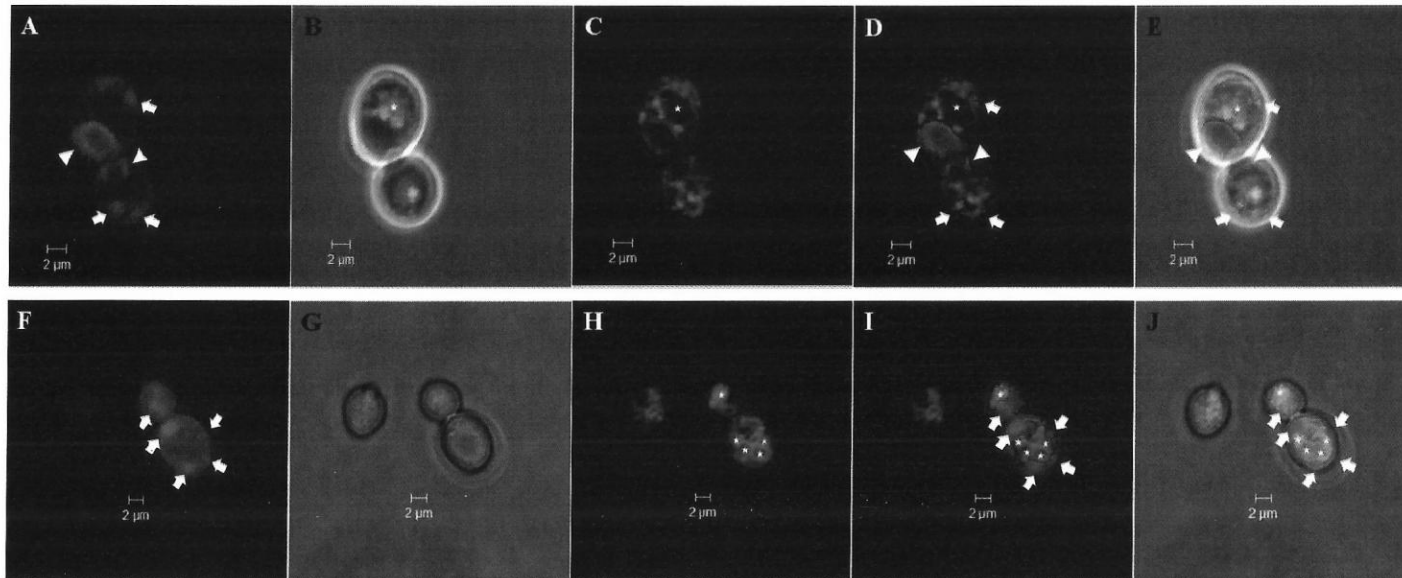
Las cepas transformadas con *p426GPD-AtDFG10-1c-HA* no presentan una reversión del fenotipo de la mutante *dfg10Δ* tanto en el ensayo de sensibilidad a Sortin2 ni en el patrón de glicosilación de CPY. Sin embargo, no podemos descartar que un defecto en la destinación subcelular de *AtDFG10-1* impida que esta complemente la función de *ScDFG10*. El sistema de expresión es heterólogo y además se trata de una levadura mutante, por lo cual es plausible hipotetizar que *AtDFG10-1* se encuentra en un compartimento errado como explicación a este fenómeno. Para evaluar esta hipótesis se analizó la localización subcelular de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* fusionadas a eGFP en las cepas *dfg10Δ* transformadas con los vectores *p426GPD-AtDFG10-1c-eGFP* y

p426GPD-*AtDFG10-2c*-eGFP. Se observa mediante microscopia confocal que la fluorescencia asociada a eGFP está localizado en el lumen de la vacuola (Figura 9), ya que está delimitada por la fluorescencia del marcador endocítico FM4-64, la cual en estas condiciones se localiza en la membrana vacuolar (Vida, T. & Emr S., 1995). En cambio la versión de *AtDFG10-2* fusionado a eGFP se encuentra localizada en estructuras punteadas y ovoidales que no colocalizan con el marcador FM4-64 (Figura 10). Por lo tanto, estos resultados indicarían que *AtDFG10-1* posee una localización subcelular distinta a la de *AtDFG10-1* en *dfg10Δ*. Este resultado deja abierta la posibilidad de que *AtDFG10-1* posea la misma función que *ScDFG10* si es que se localizara de forma similar a *AtDFG10-2*.





**Figura 9 - Localización subcelular de AtDFG10-1-GFP en la cepa *dfg10Δ*.** Se muestra imágenes de células pertenecientes a dos colonias independientes de *dfg10Δ-AtDFG10-1c-eGFP* (A-E y F-J, respectivamente) A, F. Muestra la localización subcelular de AtDFG10-1-GFP. B, G. Campo claro de las imágenes en A y F. C, H. Se muestra endosomas y vacuolas mediante el uso del marcador endocítico FM4-64 a 25 (C) y 40 minutos (H) de incubación, respectivamente. D, I. Sobreposición de las imágenes de localización subcelular de AtDFG10-1-GFP y las de FM4-64 correspondientes. E, J. Sobreposición de las imágenes de localización subcelular de GFP, FM4-64 y el campo claro. En estrellas se indica la vacuola. Las imágenes presentan un aumento de 4410x, las barras de tamaño representan 2μm.



**Figura 10 – Localización subcelular de AtDFG10-2-GFP en la cepa *dfg10Δ*.** Se exhibe imágenes de células de dos colonias independientes de *dfg10Δ-AtDFG10-2c-eGFP* (A-E y F-J, respectivamente) **A, F.** Se muestra la localización subcelular de AtDFG10-2-GFP. **B, G.** Campo claro de las imágenes en A y F. **C, H.** Endosomas y vacuolas son visualizados mediante el marcador endocítico FM4-64 a 25 (C) y 40 minutos (H) de incubación respectivamente. **D, I.** Sobreposición de las imágenes de localización subcelular de AtDFG10-2-GFP y las de FM4-64 correspondientes. **E, J.** Sobreposición de las imágenes en D e I y campo claro. En estrellas se indica la vacuola; los triángulos y flechas apuntan a estructuras ovaladas y punteadas respectivamente, las cuales no colocalizan con el trazador endocítico. Las imágenes presentan un aumento de 4410x, las barras de tamaño representan 2μm. .

## 4.2.- Estudio de la función de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en *Arabidopsis thaliana*.

### 4.2.1.- Obtención de líneas homocigotas de mutantes insercionales de T-DNA que interrumpen a los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.

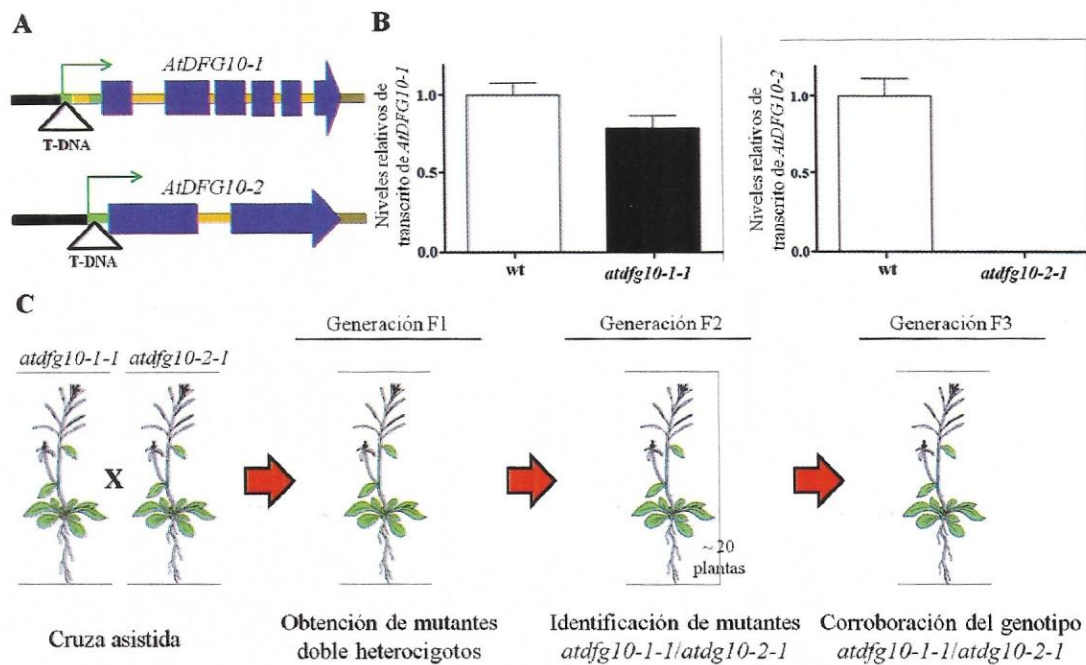
Para evaluar la función de los genes *AtDFG10s* en *Arabidopsis thaliana* se decidió utilizar la estrategia de genética reversa estudiando líneas mutantes en los genes de interés a lo largo de su desarrollo y su respuesta a compuestos que alteran el sistema de endomembranas. Estas mutantes corresponden a mutantes que poseen una inserción de T-DNA que interrumpe los genes *AtDFG10s*. Es importante estudiar líneas mutantes homocigotas para la inserción en cuestión, ya que por una parte se estabiliza el genotipo en las generaciones posteriores, pero lo más importante es que se tiene mejor opción de obtener la pérdida de función del gen en estudio. En mi Seminario de Título, se logró obtener dos líneas mutantes independientes que presentan, de manera homocigota, una inserción de T-DNA en la región no traducible 5' de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, las cuales son denominadas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*, respectivamente (Figura 11A).

Para evaluar los niveles de los transcritos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* respectivamente, se cuantificó mediante RT-PCR semicuantitativo (Figura 11B). Se determinó que la línea *atdfg10-1-1* presenta una disminución de aproximadamente 20% del transcrito de *AtDFG10-1* con respecto a las plantas silvestres. En la línea *atdfg10-2-1* no fue posible detectar transcrito *AtDFG10-2* (Figura 11B). Estos resultados sugieren que *atdfg10-1-1* es una línea mutante con pérdida de función parcial de *AtDFG10-1*, mientras que *atdfg10-2-1* es una línea con probablemente pérdida de función completa de *AtDFG10-2*.

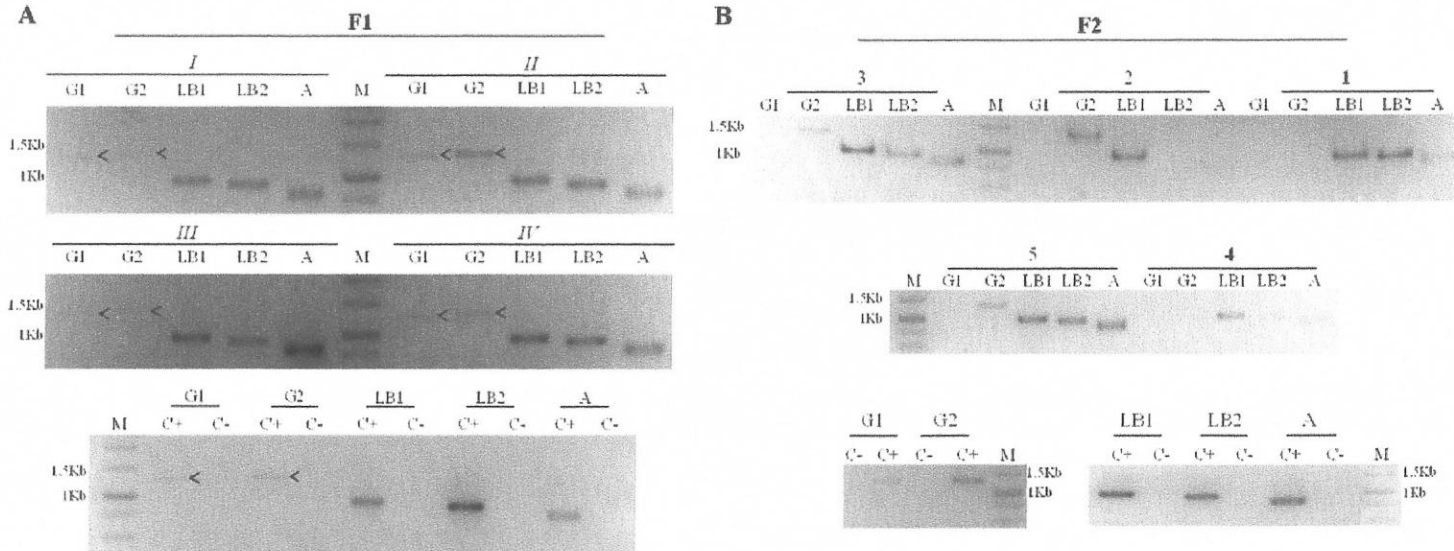
Debido a que ambos genes *AtDFG10s* podrían tener la misma función en *A. thaliana* se decidió obtener una línea mutante que posea las inserciones de T-DNA en ambos genes de manera homocigota. Se esperaría que esta mutante doble tenga un fenotipo alterado de manera similar a las mutantes individuales pero con un grado más severo. La mutante doble se denominó *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. Para obtener la línea mutante doble homocigota *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* se cruzaron plantas de las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*. La generación F1 de esta cruce se espera que sea 100% heterocigota para ambas inserciones, ya que ambas se encuentran en distintos cromosomas. Se analizó el genotipo de F1 mediante PCR detectando la presencia de los fragmentos que interrumpen los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en el DNA genómico. De las cuatro plantas F1 analizadas, en todas se observa un amplificado que refleja la presencia de las inserciones en los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* (Figura 12A). También se observa que las plantas poseen los alelos silvestres de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* (carriles G1 y G2, respectivamente, Figura 12A). Este resultado muestra que las plantas analizadas presentan el genotipo heterocigoto para cada una de las inserciones. Luego, se obtuvo la siguiente generación F2 por autocruza de plantas F1 para obtener plantas que presenten las dos inserciones de T-DNA de manera homocigota. En la Figura 12B se muestra la genotipificación de 5 plantas, de un total de 22 plantas analizadas, pertenecientes a la generación F2. En las plantas 1 y 4 se detecta la presencia de ambas inserciones en los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* mediante PCR (Figura 12B). Además, no se detecta amplificado alguno del alelo silvestre de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* (Figura 12B). Este resultado muestra que las plantas 1 y 4 presentan el genotipo homocigoto para cada una de las inserciones. En la Tabla 10.a se

muestra el resumen de la genotipificación de las 22 plantas analizadas de la generación F2 donde se observa la segregación de las dos inserciones de T-DNA en la población. El genotipo más abundante es el doble heterocigoto *AtDFG10-1 -/+ AtDFG10-2 -/+*, lo cual es lo esperado para una segregación mendeliana sin eventos de ligamiento. No se identificaron plantas para todos los genotipos esperados, probablemente debido al bajo número de plantas analizadas. No obstante, se detectaron dos plantas con el genotipo doble homocigoto de interés, *AtDFG10-1 -/- AtDFG10-2 -/-*.

Para corroborar que la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* posee efectivamente ambas inserciones de T-DNA de manera homocigota, se determinó el genotipo de la progenie de las plantas doble homocigota de la generación F2, la generación F3. En la Tabla 10.b, se muestra el resultado de la genotipificación de 11 plantas de la progenie de una *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. En el 100% de las plantas analizadas se observa que el genotipo de doble inserción en homocigosis de su progenitora se preserva. Por lo tanto, estos resultados indican que se obtuvo la línea mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* la cual posee interrumpidos los dos alelos silvestres de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.



**Figura 11 – Líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* y estrategia de la obtención de la línea doble mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*.** A. Representación de la posición relativa de las inserciones de T-DNA (triángulo vacío) en los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en las líneas mutantes simples *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*, respectivamente. Las cajas púrpuras representan la secuencia codificante del gen cuya orientación es indicada por la flecha; las líneas amarillas, los intrones; las líneas verdes y grises, las secuencias no traducibles 5' y 3', respectivamente y las líneas negras, las regiones promotoras. B. Cuantificación relativa de los niveles de transcrito de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*, respectivamente, mediante RT-PCR semicuantitativo. N= 3 plantas por cada línea. C. Se muestra la estrategia de obtención de la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*: se cruzan de manera asistida las mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*. La generación F1 se genotipifica por PCR corroborando la condición heterocigota de los fragmentos de T-DNA en los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*. La generación F2 se obtiene por autocruza y se genotipifican por PCR. Se identifican las que presenten el genotipo homocigoto para ambas inserciones (*atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*). La progenie de las plantas *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* (generación F3) se genotipifican por PCR para corroborar la homocigosis de los dos fragmentos de T-DNA en el 100% de la progenie.



**Figura 12 - Identificación de las plantas de la línea doble mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*.** Electroforesis de los productos de PCR de la genotipificación de las plantas pertenecientes a la generación F1 y F2. La presencia de la inserción de T-DNA que interrumpe los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se muestra en la reacción LB1 y LB2, respectivamente; la presencia del alelo silvestre del gen *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se detecta en la reacción G1 y G2, respectivamente. El carril A representa la amplificación de un fragmento del gen de actina para corroborar la calidad del DNA genómico. Se muestran los controles positivos (C+, DNA genómico de plantas *atdfg10-1-1* o *atdfg10-2-1*) y negativos (C-, sin DNA) de los correspondientes productos de PCR. **A.** Genotipificación de plantas I, II, III y IV de la generación F1. Las cuatro plantas analizadas muestran el genotipo heterocigoto para las dos inserciones de T-DNA. Las puntas de flechas apuntan a los amplificados en las reacciones G1 y G2. **B.** Genotipificación de las plantas 1, 2, 3, 4 y 5 de la generación F2. Las plantas 1 y 4 (en negritas) poseen las dos inserciones de T-DNA y carecen del alelo silvestre de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, por lo que ambas plantas presentan el genotipo homocigoto para las dos inserciones de T-DNA. M, Marcador de peso molecular.

**Tabla 10 – Segregación de las dos inserciones de T-DNA que interrumpen los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.**

**A**

Genotipo	Nº de plantas	Genotipo	Nº de plantas	Genotipo	Nº de plantas
<i>AtDFG10-1</i> +/+ <i>AtDFG10-2</i> +/+	0	<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> +/-	7 (32%)	<i>AtDFG10-1</i> +/+ <i>AtDFG10-2</i> -/-	0
<i>AtDFG10-1</i> +/+ <i>AtDFG10-2</i> +/-	3 (14%)	<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> -/-	3 (14%)	<i>AtDFG10-1</i> -/- <i>AtDFG10-2</i> +/+	0
<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> +/+	5 (23%)	<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> -/-	2 (9%)	<i>AtDFG10-1</i> -/- <i>AtDFG10-2</i> -/-	2 (9%)

**B**

Genotipo	Nº de plantas	Genotipo	Nº de plantas	Genotipo	Nº de plantas
<i>AtDFG10-1</i> +/+ <i>AtDFG10-2</i> +/+	0	<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> +/-	0	<i>AtDFG10-1</i> +/+ <i>AtDFG10-2</i> -/-	0
<i>AtDFG10-1</i> +/+ <i>AtDFG10-2</i> +/-	0	<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> -/-	0	<i>AtDFG10-1</i> -/- <i>AtDFG10-2</i> +/+	0
<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> +/+	0	<i>AtDFG10-1</i> +/- <i>AtDFG10-2</i> -/-	0	<i>AtDFG10-1</i> -/- <i>AtDFG10-2</i> -/-	11 (100%)

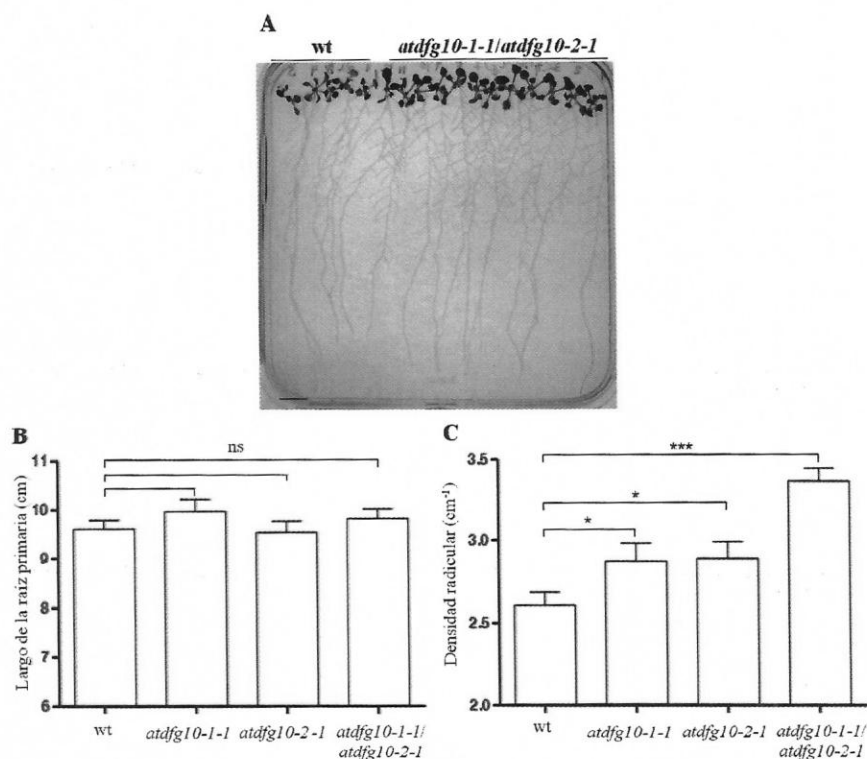
Se muestra el resultado del análisis del genotipo de 22 plantas de la generación F2 (A) de la cruce de las mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*. Once plantas de la generación F3 de una planta F2 homocigota para las dos inserciones de T-DNA fueron analizadas (B). Entre paréntesis se señala la segregación de los genotipos obtenidos con respecto al total de plantas analizadas.

#### 4.2.2.- Caracterización fenotípica de las líneas mutantes homocigotas.

Para estudiar el impacto que posee la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en el desarrollo de *Arabidopsis*, se observó el crecimiento de las plantas mutantes *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1*, *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* y se comparó con las plantas silvestres mediante la cuantificación de algunos parámetros del desarrollo de la raíz como son la longitud de la raíz primaria y la densidad de raíces laterales. Se enfocó el estudio fenotípico en la raíz, ya que *Sortin2* afecta principalmente este órgano. Para



comparar los parámetros a medir, se crecieron al mismo tiempo y en una misma placa plantas de una línea mutante con plantas silvestres. En la Figura 13A, se muestra el crecimiento de plántulas *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* de 14 días post-siembra en comparación a plántulas silvestres de la misma edad. Se distingue un aparente aumento en el número de raíces laterales en la línea mutante con respecto a las plántulas silvestres sin una diferencia apreciable en el tamaño de la raíz primaria. En la Figura 13B se observa que las tres líneas mutantes no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la longitud de la raíz primaria en comparación a las plantas silvestres (*atdfg10-1-1*: 9,97±0,18 cm; *atdfg10-2-1*: 9,54±0,23cm; *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*: 9,92±0,22cm; plantas silvestres: 9,61±0,18cm). En cuanto a la densidad radicular, la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* presenta un aumento estadísticamente significativo (3,35±0,07cm<sup>-1</sup>) en comparación a lo registrado en las plantas silvestres (2,59±0,07cm<sup>-1</sup>) (Figura 13C). También existe un aumento de la densidad radicular (número de raíces laterales/cm de raíz primaria) estadísticamente significativo en las líneas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* con respecto a las plantas silvestres, pero este aumento es menor que lo registrado en la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* (*atdfg10-1-1*: 2,87±0,11cm<sup>-1</sup>; *atdfg10-2-1*: 2,89±0,10cm<sup>-1</sup>). Estos resultados sugieren que los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* son importantes para el desarrollo de *A. thaliana*, en específico en la formación de raíces laterales. Se observó que el incremento en la densidad radicular se potencia en la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* en comparación a las líneas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*, lo que sugiere que los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* participarían en el mismo proceso en este organismo.



**Figura 13 – Fenotipo radicular de plantas mutantes en los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.** A. Se muestra una fotografía representativa del crecimiento de las plántulas de 14 días post-siembra de la línea *atdfg10-1/atdfg10-2-1* en comparación a las plantas silvestres (wt). La barra de tamaño indica 1 cm. B, C. Se muestra la cuantificación del largo de la raíz primaria (B) y la densidad radicular (C, número de raíces laterales/cm de raíz primaria) en plantas silvestres (N=34) y las líneas mutantes *atdfg10-1-1* (N=22), *atdfg10-2-1* (N=22) y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* (N=40). Las barras reflejan el promedio del parámetro analizado con su error estándar. Los símbolos sobre las barras indican el nivel de significancia entre dos grupos analizados: ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (en B y C, prueba t de Student de dos colas)

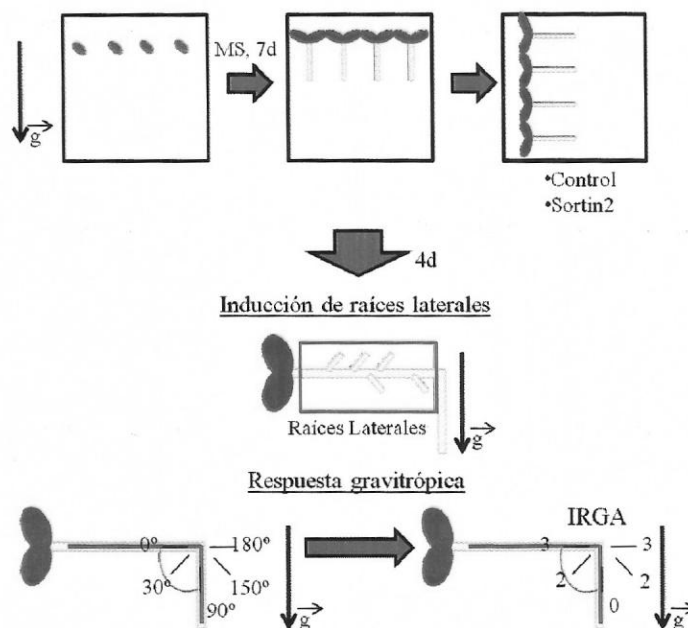
#### 4.2.3.- Estudio de la resistencia al efecto de Sortin2 en las líneas mutantes que poseen interrumpido los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.

Anteriormente se informó que la cepa *dfg10Δ* es resistente a la acción de Sortin2 en comparación a la cepa parental. Se mostró que *AtDFG10-2* complementa la función de *ScDFG10* (Figura 8 y Tabla 9), por lo cual *AtDFG10-2* podría poseer un papel importante en la acción de Sortin2 en *A. thaliana*. Por otra parte, se ha descrito en plantas que Sortin2 posee diversos efectos fisiológicos de los cuales los más notorios son

la inducción de raíces laterales y la alteración en la respuesta gravitrópica radicular (Pérez, P. 2009; Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Además, a nivel celular, se ha reportado que Sortin2 induce la aceleración del tráfico endocítico (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Entonces, para estudiar la participación de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en la acción de Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*, se estudió la respuesta a Sortin2 que muestran las líneas *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* en comparación a la presentada por las plantas silvestres enfocándose en los fenotipos descritos.

En la Figura 14 se esquematiza la estrategia que se utilizó para observar y cuantificar el efecto fisiológico de Sortin2 en estas mutantes. Plántulas de 7 días fueron traspasadas a tratamientos con Sortin2; como condición control se traspasaron plántulas a placas con medio de cultivo sin Sortin2. En ambas condiciones las placas fueron giradas en 90° de forma perpendicular al vector de gravedad. Después de 4 días del inicio de este tratamiento, se cuantificó la respuesta al estímulo gravitrópico de la raíz primaria y el número de raíces laterales. La respuesta gravitrópica se evaluó mediante la medición del ángulo de curvatura de la raíz primaria. Esta respuesta se visualizó mediante un histograma de frecuencias modificado donde el ángulo formado por la raíz principal se tabuló en intervalos de 30° cada uno (ver sección 3.4 de Materiales y métodos). Se estableció que 0° es la posición de la raíz primaria al comenzar el tratamiento, en consiguiente, 90° es la respuesta normal de una raíz de una planta silvestre al estímulo gravitrópico aplicado. Debido a que esta respuesta es difícil de analizar de manera cuantitativa, se determinó el índice denominado Índice de Respuesta Gravitrópica Aberrante, IRGA, que básicamente es un penalizador que informa la diferencia de la respuesta gravitrópica observada en una línea con respecto a la respuesta

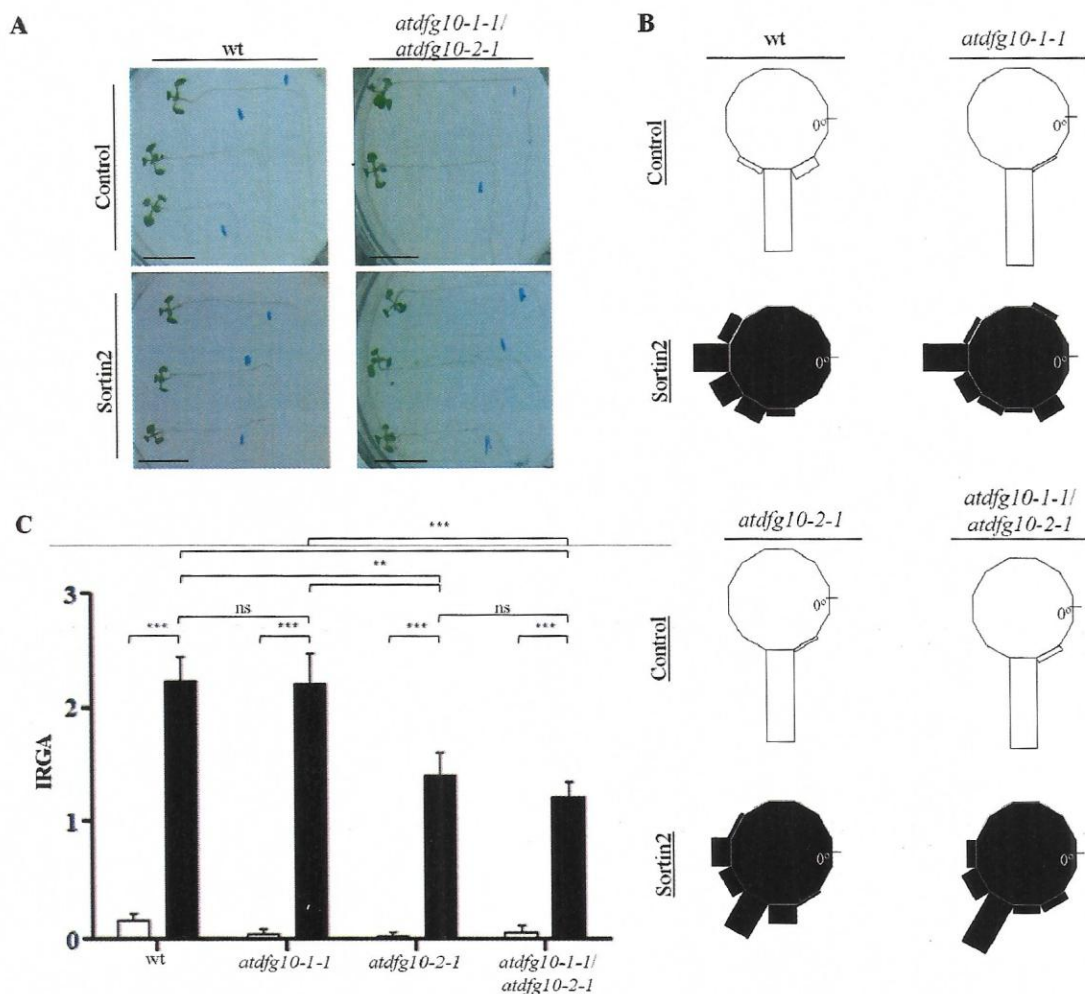
normal de la raíz de las plantas silvestres. Por ende, el valor IRGA igual a cero es asignado a la respuesta normal. El valor 1 se asigna a los intervalos adyacentes al que comprende  $90^\circ$  y de esa manera va en aumento el valor mientras más se aleja de la respuesta normal. Por ende, mientras más positivo es este parámetro, más aberrante es la respuesta de la planta al cambio de la dirección del vector de gravedad bajo estos ensayos.



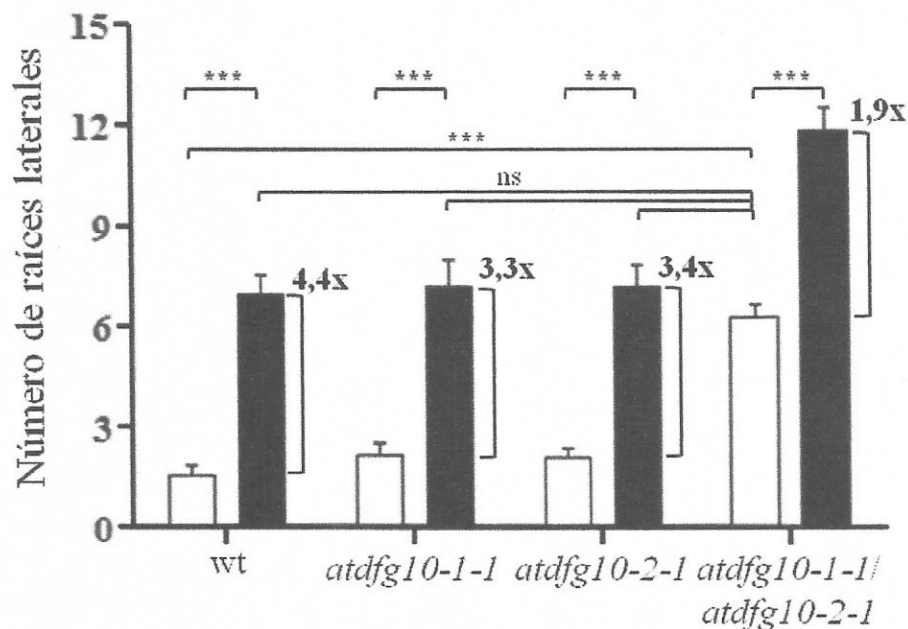
**Figura 14 – Evaluación del efecto fisiológico de Sortin2 en las plántulas de *Arabidopsis thaliana*.** Se resume la estrategia seguida para evaluar el efecto que posee Sortin2 en las plántulas de *Arabidopsis*. Plántulas de 7 días post - siembra fueron transferidas a placas que contienen medio de cultivo o medio de cultivo suplementado con Sortin2  $25\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se crecieron perpendicularmente con respecto al vector de gravedad (dirección de la flecha indica la dirección del vector de gravedad, g). Al término del cuarto día (4d), se analizó la inducción de raíces laterales y la respuesta gravitrópica de la raíz primaria. Se cuantificó esta respuesta midiendo el ángulo de curvatura de la raíz primaria. Se tabularon los resultados en doce intervalos de  $30^\circ$  cada uno. Se definió a  $0^\circ$  como la posición de la raíz al comenzar el tratamiento. Se definió el parámetro IRGA, el cual es considerado un penalizador a la respuesta anormal de una raíz al cambio de dirección de la gravedad. El valor 0 representa el intervalo de la respuesta normal esperada del crecimiento radicular en condiciones control. Mientras más se aleja del comportamiento ideal, más positivo es el parámetro.

En la Figura 15A, se muestra el fenotipo de las plantas *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* y silvestres (wt) sometidas al tratamiento con Sortin2 el cual se muestra esquematizado en la Figura 14. Se observa que las raíces primarias de las plantas silvestres muestran una clara pérdida de su respuesta gravitrópica en presencia de Sortin2. Sin embargo las raíces de las plantas *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* responden al estímulo gravitrópico, aunque en menor medida a lo observado en su condición en ausencia de Sortin2 (Figura 15A y B). En la Figura 15B se observa que en la condición control (gráficos blancos) las raíces de todas las líneas mutantes analizadas responden al estímulo gravitrópico de manera similar a las plantas silvestres. En la condición con Sortin2 (gráficos negros), todas las líneas presentan una alteración de la respuesta gravitrópica, no obstante, se observan diferencias entre las líneas analizadas (Figura 15B). En las plantas silvestres y en la línea *atdfg10-1-1*, se registra que en gran parte de su población las raíces no son capaces de orientar la raíz primaria en sentido de la gravedad. En contraste, en las líneas *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* se observa que la mayoría de las plántulas pueden detectar el cambio de dirección del vector de gravedad y dirigir su crecimiento radicular en el nuevo sentido. En la Figura 15C, se observa la cuantificación de la respuesta aberrante promedio (IRGA) registrada en las líneas analizadas tanto en presencia como en ausencia a Sortin2. Se corrobora la conformación de dos grupos, uno sensible a Sortin2 (plantas silvestres y la línea *atdfg10-1-1*) y otro más resistente al efecto de Sortin2 (líneas *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*). Estos resultados indican que las líneas *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* son resistentes al efecto de Sortin2 en la respuesta gravitrópica radicular. Por lo tanto, *AtDFG10-2* es importante para la acción de Sortin2 a nivel de la respuesta gravitrópica radicular en *A. thaliana*.

En la Figura 16 se muestra la cuantificación del número de raíces laterales de las líneas mutantes en presencia de Sortin2. Interesantemente, las plantas de la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* presentan un mayor número de raíces laterales (6,3 +/- 0,36) que las plantas silvestres. Este número de raíces laterales es muy similar a lo desarrollado por las plantas silvestres y mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* expuestas a Sortin2 (6,9 +/- 0,67; 7,2 +/- 0,67; 7,2 +/- 0,82, respectivamente). Esto sugiere que la pérdida de función de ambos genes, *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, fenocopia el efecto de Sortin2 en la inducción de raíces laterales. También se puede apreciar que todas las líneas analizadas son sensibles al efecto inductor de raíces laterales de Sortin2. Sin embargo, en un análisis más detallado, se observa que la tasa de la inducción en la formación de raíces laterales dependiente de Sortin2 en las mutantes de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, es considerablemente menor con respecto a las plantas silvestres (Figura 16). Las veces de inducción disminuyen desde las 4,4 veces en plantas silvestres a alrededor de 3,3 veces en las plantas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* y a 1,9 veces en las plantas *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. Estos resultados muestran que la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* es más resistente a la acción de Sortin2 que las mutantes simples en estos genes. Por lo tanto, *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en conjunto son importantes para la inducción de raíces laterales dependiente de Sortin2 en *A. thaliana*.



**Figura 15 – Efecto de Sortin2 sobre la respuesta gravitrópica de raíces de plantas mutantes en los genes *AtDFG10s*.** A. Fotografías representativas de plantas silvestres (wt) y plantas de la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* luego del estímulo gravitrópico en el tratamiento control y con Sortin2. La barra de tamaño indica 1 cm. B. Se muestra la cuantificación de la respuesta gravitrópica radicular en tratamientos control (en blanco) de plantas silvestres (wt, N= 36), *atdfg10-1-1* (N=24), *atdfg10-2-1* (N=35) y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* (N=17) y con Sortin2 (en negro; wt, N=33 plantas; *atdfg10-1-1*, N=30; *atdfg10-2-1*, N=36 y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*, N=27). C. Se muestra el IRGA (Índice de Respuesta Gravitropica Aberrante) de los resultados en B. Las barras blancas y negras corresponden a los tratamientos control y Sortin2, respectivamente con su error estándar. Los símbolos sobre las barras indican el nivel de significancia entre dos grupos analizados: ns,  $p > 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas).



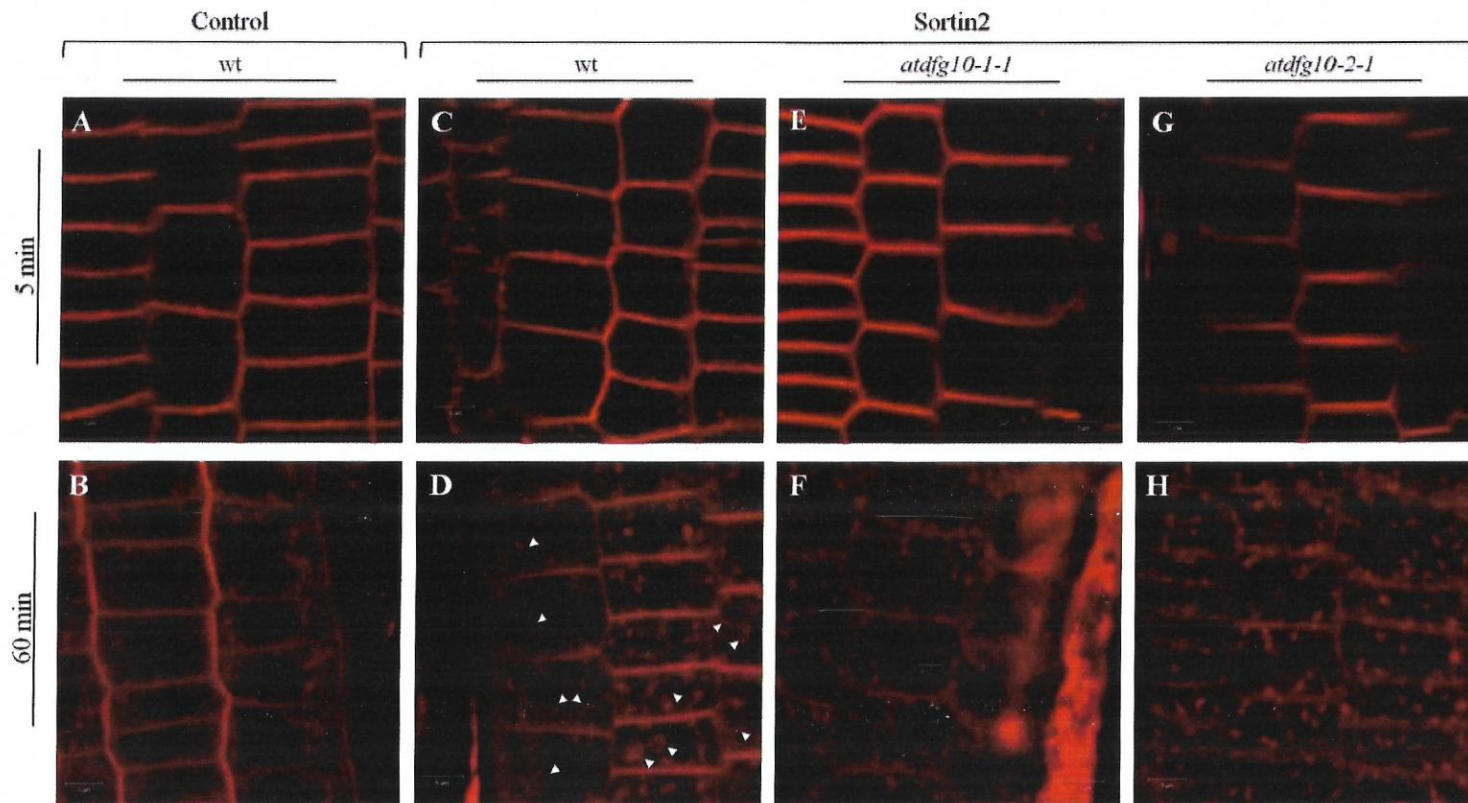
**Figura 16 – Efecto de Sortin2 en la inducción de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes en los genes *AtDFG10s*.** Se muestra la cuantificación del número de raíces laterales en la condición control (barras blancas) y con Sortin2 (barras negras) en plantas silvestres (wt), *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. Se indican las veces de inducción de raíces laterales dependiente de Sortin2. Las barras señalan el promedio del número de raíces laterales por planta y su error estándar. La significancia entre dos grupos analizados es expresada como ns,  $p > 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (prueba ANOVA de una vía con posterior prueba de Tukey).

Como se ha mencionado, Sortin2 afecta la ruta endocítica por lo que resulta interesante evaluar el efecto de Sortin2 en la endocitosis de las mutantes con falta de función en los genes *AtDFG10s*. En la Figura 17 se muestra el efecto de Sortin2 en la ruta endocítica de las plantas silvestres y las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*. Se observa que en las plantas silvestres en tratamiento con Sortin2, el trazador endocítico FM4-64 luego de 60 minutos, presenta un patrón punteado intracelular y también con cuerpos ovalados en las células de la corteza de la raíz, los cuales corresponden a endosomas y cuerpos tipo vacuolares, respectivamente (Figura 17D).



Estas estructuras ovaladas no se observan en las plantas silvestres expuestas por 60 minutos al medio sin Sortin2 (Figura 17B). La presencia de FM4-64 en estos cuerpos tipo vacuolares, un organelo más tardío dentro de la temporalidad de la ruta endocítica, da cuenta de la aceleración del tráfico endocítico en las plantas silvestres como se ha sido reportado por Pérez-Henríquez, P. & col. (2012). Al evaluar el efecto de Sortin2 en la temporalidad de la ruta endocítica en las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*, se observa que a 60 minutos de exposición Sortin2, FM4-64 en ambas mutantes presenta un patrón punteado en las células analizadas sin embargo no se observan estas estructuras ovaladas que presentan las plantas silvestres en el tratamiento con Sortin2 (Figura 17F y G, respectivamente). Este resultado sugiere que las líneas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* son resistentes a la acción de Sortin2 a nivel del tráfico endocítico.

En conjunto, los resultados mostrados en las Figuras 15, 16 y 17 indican que la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* es importante para la acción de Sortin2 en *Arabidopsis*. Esto se observa tanto a nivel fisiológico, en la inducción de raíces laterales como en la respuesta gravitrópica de la raíz y también a nivel celular en el proceso de endocitosis.



**Figura 17 – Efecto de Sortin2 en el tráfico endocítico en raíces de plantas silvestres y líneas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*.** Se muestran imágenes representativas de 5 minutos (A-D) y 60 minutos (E-H) de internalización de FM4-64 5  $\mu$ M en células de raíces de plantas de 7 días post-siembra en el tratamiento control y Sortin2. **A, E.** Plantas silvestres (wt) en tratamiento control. **B, F.** Plantas silvestres tratadas con Sortin2. **C, G.** Plantas *atdfg10-1-1* tratadas con Sortin2 50  $\mu$ g/mL. **D, H.** Plantas *atdfg10-2-1* tratadas con Sortin2 50  $\mu$ g/mL. Los triángulos blancos muestran estructuras ovaladas (D) que no se observan en plantas silvestres bajo el tratamiento control (B) ni en plantas *atdfg10-1-1* (F) y *atdfg10-2-1* (H) bajo el tratamiento con Sortin2. Las imágenes presentan un aumento de 2000X, las barras de tamaño indican 5  $\mu$ m.

4.2.4.- Estudio del efecto de Tunicamicina en las líneas mutantes que poseen interrumpido los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.

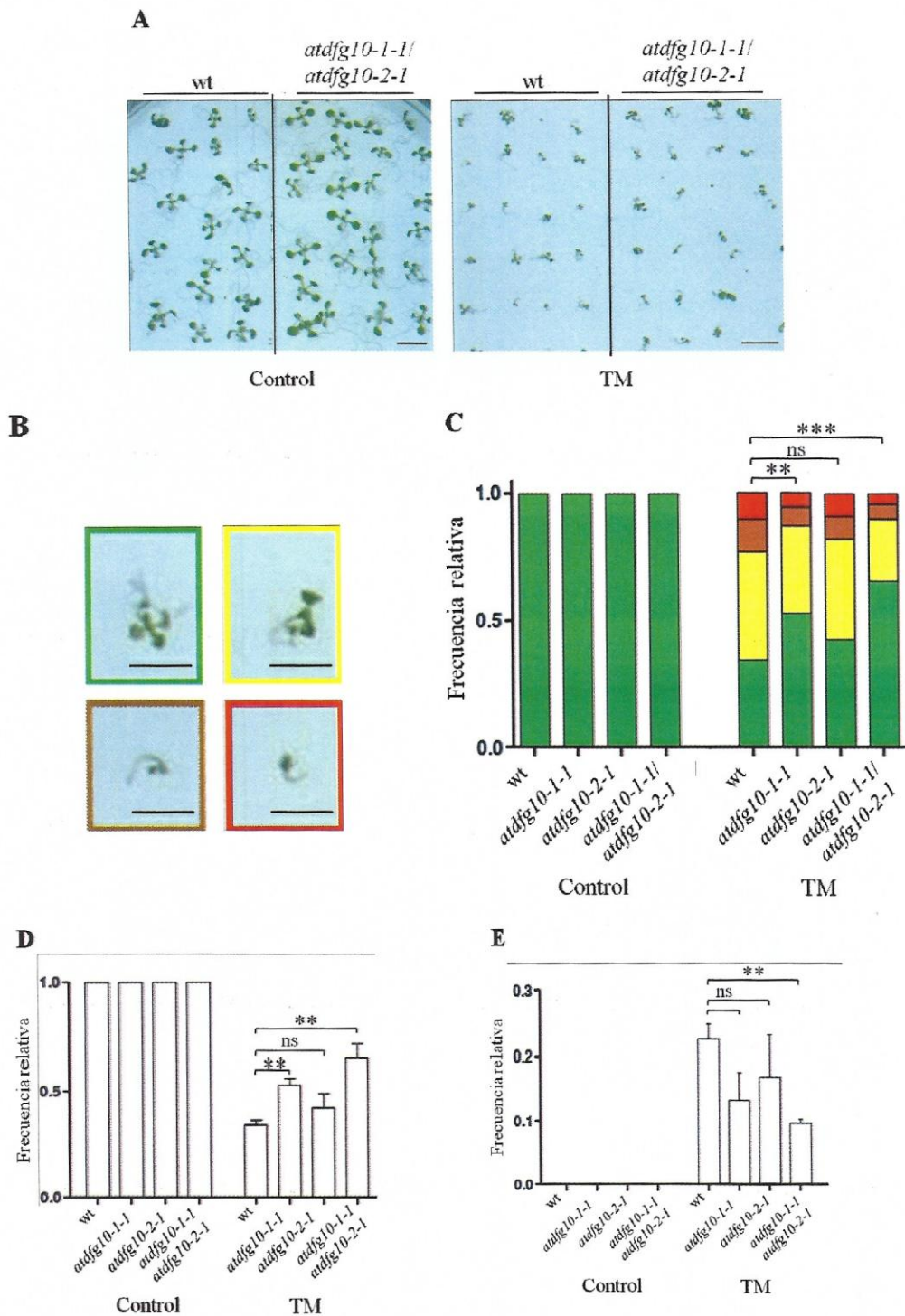
La mutante *dfg10Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* presenta deficiencias en el proceso de N-glicosilación de proteínas, lo que es explicado debido a que ScDFG10 participa en la biosíntesis de dolicol en levaduras, importante lípido determinante en esta modificación post-traducciona (Cantagrel, V. & col. 2010). En este trabajo se ha mostrado que *AtDFG10-2* puede complementar la función del gen *ScDFG10* con respecto a la N-glicosilación de proteínas (Figura 8B, 9 y 10), por lo que la función de *AtDFG10-2* podría participar en la N-glicosilación de proteínas en *A. thaliana*.

Tunicamicina (TM) se ha caracterizado como un potente inhibidor de la N-glicosilación de proteínas en diversos modelos de estudios, lo que podría inducir el aumento de proteína mal plegada en el retículo endoplásmico con la consiguiente inducción de respuesta a proteína mal plegada (UPR) (Iwata, Y. & Koizumi, N. 2012). Por lo tanto, si los genes *AtDFG10s* participan en la N-glicosilación de proteínas en *A. thaliana*, la alteración funcional de estos genes debería provocar algún efecto en la tolerancia a la acción de este compuesto químico. Para estudiar la participación que poseen los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en la acción de Tunicamicina en *Arabidopsis*, se evaluó la respuesta fisiológica que presentan las líneas *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* expuestas a este inhibidor en comparación a la registrada por las plantas silvestres. La Figura 18 muestra los resultados del análisis del fenotipo foliar de estas líneas germinadas y crecidas por 12 días a una concentración subletal de Tunicamicina (Zhang, H. & col. 2008; Nagashima, Y. & col. 2011). Cualitativamente, se observa que plantas silvestres y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* presentan

una gran disminución del tamaño de sus órganos foliares en presencia de Tunicamicina comparado a su tamaño en el tratamiento control (Figura 18A). Se distinguieron 4 tipos de fenotipos alterados en las plantas crecidas en Tunicamicina (Figura 18B): plantas que presentan cotiledones cerrados o deformes; plantas con cotiledones abiertos pero sin presentar su primer par de hojas verdaderas; plantas que poseen su primer par de hojas verdaderas cerradas aun y plantas con su primer par de hojas verdaderas y expandidas. En la condición control, se observó que todas las plantas de las tres líneas mutantes analizadas presentan su primer par de hojas verdaderas expandidas al igual que las plantas silvestres (Figura 18C). Se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar la proporción de los 4 distintos fenotipos registrados en Tunicamicina entre las plantas silvestres (wt) y las líneas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*, en contraste con lo que se registra en la línea *atdfg10-2-1* (Figura 18C). Existe una mayor proporción de plantas con un desarrollo foliar similar a la situación control (hojas verdaderas expandidas) en las línea *atdfg10-1-1* (0,52 +/- 0,03) y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* (0,65 +/- 0,12) en comparación a lo registrado en las plantas silvestres (0,34 +/- 0,02) (Figura 18D). Al analizar la proporción de plantas que carecen de hojas verdaderas, se aprecia que la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* exhibe una menor frecuencia relativa (0,10 +/- 0,01) que las plantas silvestres (0,23 +/- 0,02). Esta disminución también se observa en las líneas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*, pero al ser comparados con el nivel relativo que exhiben las plantas silvestres, no se registran diferencias estadísticamente significativas (0,13 +/- 0,04; 0,17 +/- 0,06, respectivamente). Por lo tanto, estos resultados indican que la línea *atdfg10-1-1* y en especial la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* son menos sensibles a la acción de Tunicamicina que las plantas silvestres. Debido a que la N-glicosilación de

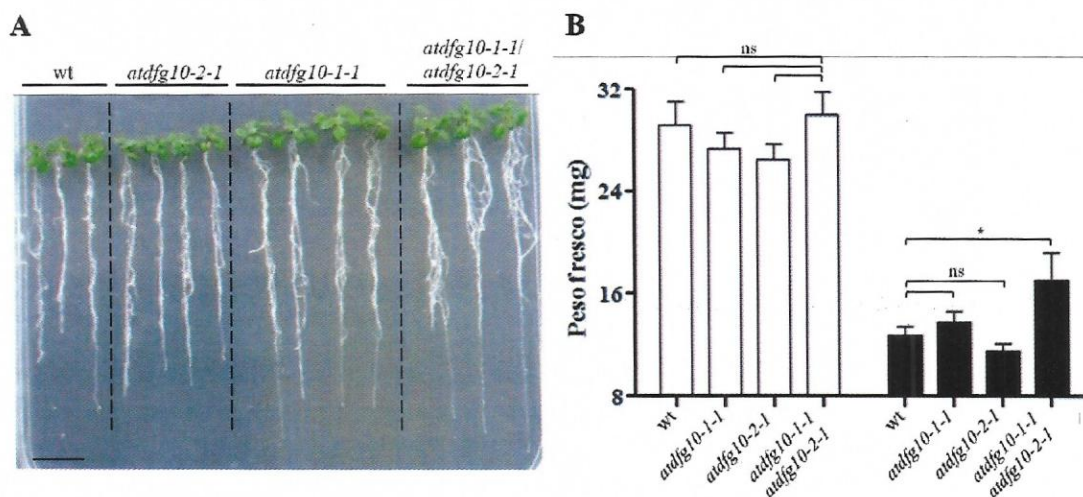
proteínas posee un gran impacto en el desarrollo de *Arabidopsis* (Figura 18A), se configuró un estudio complementario al ensayo anterior y que permite evitar los efectos pleiotrópicos de Tunicamicina en los eventos tempranos del desarrollo. Plantas de 7 días post-siembra crecidas en un medio nutritivo fueron trasplantadas a tratamientos con Tunicamicina por 14 días y se evaluó su desarrollo y biomasa. Se observa que las plantas *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* presentan un mayor tamaño tanto de la zona foliar como de la zona radicular en comparación a las plantas silvestres (Figura 19A). Al evaluar el peso fresco de las plantas luego del tratamiento se observa que la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* posee mayor biomasa (17,13g +/- 2,14g) en comparación a las plantas silvestres (12,79g +/- 0,72g) y *atdfg10-2-1* (11,63g +/- 0,54g) (Figura 19B). A pesar que las plantas *atdfg10-1-1* presentan un mayor peso fresco que las plantas silvestres (13,90g +/- 0,81g) la diferencia no es estadísticamente significativa.

En conjunto, los resultados provenientes de las Figuras 18 y 19 muestran que la línea mutante *atdfg10-1-1* y especialmente *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* son menos sensibles a la acción de Tunicamicina que las plantas silvestres. En consecuencia, se sugiere que la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* está implicada en el proceso de N-glicosilación de proteínas en este organismo. También, sugiere que *AtDFG10-1* participa de manera más directa en este proceso en *Arabidopsis*, ya que su parcial pérdida de función es suficiente para otorgar mayor resistencia al efecto de Tunicamicina en comparación a las plantas silvestres. Probablemente, *AtDFG10-2* tendría menor relevancia en estos procesos evaluados, ya que su alteración necesita de la pérdida de función de *AtDFG10-1* para otorgar mayor resistencia al efecto que ejerce Tunicamicina en *Arabidopsis*.



**Figura 18 – Efecto de Tunicamicina en el desarrollo foliar de plantas silvestres y mutantes en los genes *AtDFG10s*.** **A.** Desarrollo de plantas silvestres (wt) y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* de 12 días en medio de cultivo y medio suplementado con Tunicamicina 0,1µg/mL (TM). Las barras de tamaño indican 1 cm. **B.** Fenotipos del

desarrollo foliar en las plantas silvestres crecidas con Tunicamicina: cotiledones cerrados o deformes (destacado en rojo), cotiledones abiertos (café), presencia de cotiledones abiertos y del par de hojas verdaderas (amarillo) y presencia del par de hojas verdaderas expandidas (verde). Las barras de tamaño indican 5 mm. **C.** Frecuencia relativa de los fenotipos descritos en B de las plantas silvestres, *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* tanto en el tratamiento control (control) como en Tunicamicina (TM). **D.** Frecuencia relativa de plantas que presentan su primer par de hojas verdaderas y expandidas (C) y plantas que carecen de hojas verdaderas (D). En el tratamiento control: 3 experimentos independientes en plantas silvestres, *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y 4 experimentos independientes en *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. Para el tratamiento con Tunicamicina: 9 experimentos independientes en plantas silvestres y 4 experimentos independientes en plantas *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. Cada experimento independiente agrupa en promedio el análisis de 32 plantas por línea. Las barras representan el promedio de la frecuencia relativa de cada fenotipo respecto al total de plantas analizadas con su error estándar. Los símbolos sobre las barras indican el nivel de significancia entre dos grupos analizados: ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (C, prueba de Chi-cuadrado; D y E, prueba t de Student de dos colas)



**Figura 19 – Efecto de Tunicamicina en el crecimiento vegetativo de plantas silvestres y mutantes en los genes *AtDFG10s*.** **A.** Se muestra el fenotipo de plantas silvestres (wt), *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* de 7 días que fueron tratadas por 14 días con Tunicamicina 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La barra de tamaño indica 1 cm. **B.** Cuantificación del peso fresco de estas plantas tanto en el tratamiento control (barras blancas) como en presencia a Tunicamicina (barras negras). Para el tratamiento control: N= 8 plantas silvestres y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*; N=6 plantas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*. Para el tratamiento con Tunicamicina: N=12 plantas silvestres; N=4 plantas *atdfg10-1-1*, *atdfg10-2-1* y *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*. Las barras representan el promedio del peso fresco en cada línea con su error estándar. Los símbolos sobre las barras indican el nivel de significancia entre dos grupos analizados: ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0,05$  (prueba t de Student de dos colas).

#### 4.3- Corroboración de la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en *Arabidopsis thaliana*.

Si bien el uso de mutantes insercionales de T-DNA en Biología vegetal es muy útil y ampliamente utilizado, una de las desventajas de utilizar estas líneas mutantes es la posibilidad de que posea en su genoma más de una inserción y por lo tanto que el fenotipo observado se deba a la pérdida de función en genes distintos a los estudiados (Alonso, J. & col. 2003). Esto puede suceder, ya que las inserciones de T-DNA en el genoma ocurren al azar y no existe manera de regular su número y/o posición. Por consiguiente, se necesita corroborar si la interrupción de los genes estudiados es realmente la responsable de los fenotipos descritos. Una de las estrategias para abordar este problema es el rescate del fenotipo en las líneas mutantes de *Arabidopsis* mediante la restitución del marco de lectura abierto del gen interrumpido de forma estable. Utilizando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen vectores binarios que poseen subclonada la secuencia codificante del gen estudiado, este puede ser integrado en el genoma de las líneas mutantes.

##### 4.3.1.- Obtención de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con vectores de expresión en plantas que poseen subclonado *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*.

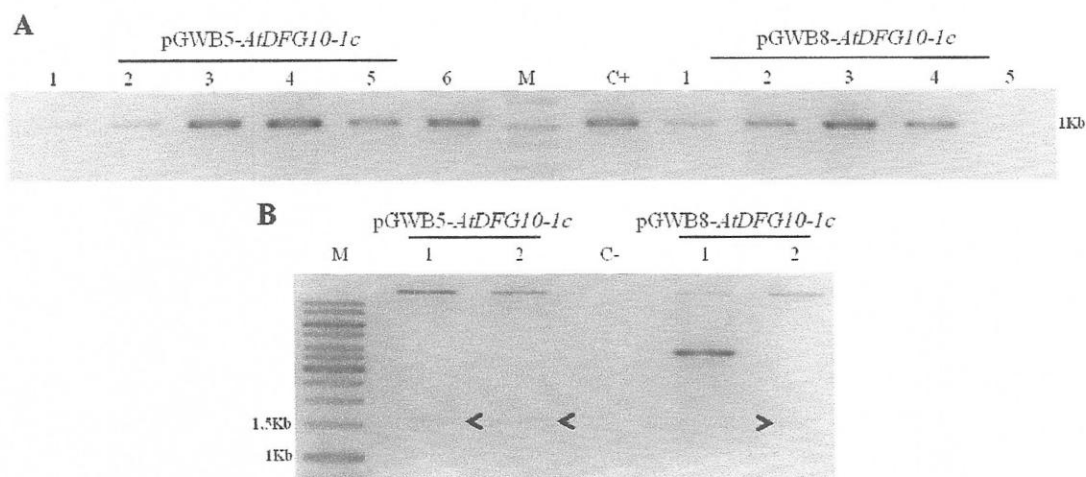
Para llevar a cabo la estrategia mencionada, lo primero que se realizó fue subclonar los marcos de lectura abiertos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en vectores que contienen promotores que permiten la expresión del gen subclonado en plantas. Anteriormente, se había obtenido vectores de clonación pCR8 que contienen subclonado a *AtDFG10-1c* y a *AtDFG10-2c* (Figura 4 y Tabla 6). Se procedió a recombinar cada



uno de estos vectores con dos plasmidios que poseen río arriba de su sitio de recombinación el promotor del ARNr 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S), el cual es de expresión constitutiva en plantas (Figura 3). Estos dos vectores, pGWB8 y pGWB5, se diferencian en que pGWB8 permite etiquetar el marco de lectura abierto del gen con una secuencia repetida seis veces en tándem que codifica para un polipéptido de histidina, mientras que pGWB5 lo hace con una secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde. En consecuencia, se obtuvieron cuatro nuevos plasmidios de expresión en plantas, dos pGWB8; pGWB8-*AtDFG10-1c* y pGWB8-*AtDFG10-2c*; y dos PGWB5; pGWB5-*AtDFG10-1c* y pGWB5-*AtDFG10-2c*.

En la Figura 20A se observa la corroboración de la subclonación de *AtDFG10-1c* mediante PCR. Se observa que en las diferentes colonias de *E. coli* transformadas con los vectores pGWB5-*AtDFG10-1c* y pGWB8-*AtDFG10-1c* resistentes a kanamicina, se amplifica una sola banda ligeramente superior a los 1000bp, similar al amplificado utilizando el cDNA total de una hoja de una planta silvestre de *Arabidopsis thaliana*. Con respecto al análisis de los patrones de digestión de los plasmidios purificados pGWB5-*AtDFG10-1c* provenientes de dos clones cumplen lo esperado (Figura 20B, Tabla 11). Con respecto a la digestión del vector pGWB8-*AtDFG10-1c*, se aprecia que el vector proveniente del clon 2 presenta un fragmento de tamaño levemente superior a 1500bp, correspondiente a lo esperado para el producto de menor tamaño del vector pGWB8-*AtDFG10-1c* en configuración sentido (Figura 20B, Tabla 11). El vector pGWB8-*AtDFG10-1c* que fue purificado del clon 1 presenta un patrón de digestión que no se ajusta a ninguna situación esperada en la digestión del vector analizado. Se realizó un procedimiento similar para corroborar la presencia y dirección de *AtDFG10-2c*

subclonado. Se utilizó PCR para pesquisar la configuración en sentido de *AtDFG10-2c* con respecto al promotor 35S en los vectores (Figura 21A y B). Se observa que en 4 diferentes clones transformados con el vector pGWB5-*AtDFG10-2c* y 2 clones provenientes de la transformación con pGWB8-*AtDFG10-2c* se amplifica una banda única de tamaño ligeramente menor a 1500pb, lo cual corresponde al tamaño esperado (Ver Figura 22C, carril C<sup>+</sup>). La digestión enzimática del vector pGWB5-*AtDFG10-2c* proveniente del clon 3, se obtiene 7 fragmentos (Figura 21C) los cuales corresponden al tamaño esperado (Tabla 12), en especial, el fragmento de menor tamaño (1259pb), el cual es el indicador de la configuración en sentido de *AtDFG10-2c* subclonado. En cuanto a la corroboración de pGWB8-*AtDFG10-2c* por patrones de restricción, no se encontró una endonucleasa que permitiera diferenciar la configuración de *AtDFG10-2c* con respecto al promotor 35S. A pesar de este inconveniente, se observa seis fragmentos productos de la digestión enzimática, los cuales presentan los tamaños especificados para la digestión del vector pGWB8-*AtDFG10-2c* (Figura 21D, Tabla 12). Por lo tanto, con estos resultados se corroboró la obtención de cuatro vectores de expresión constitutiva en plantas los cuales poseen *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* en la configuración correcta con respecto al promotor 35S.

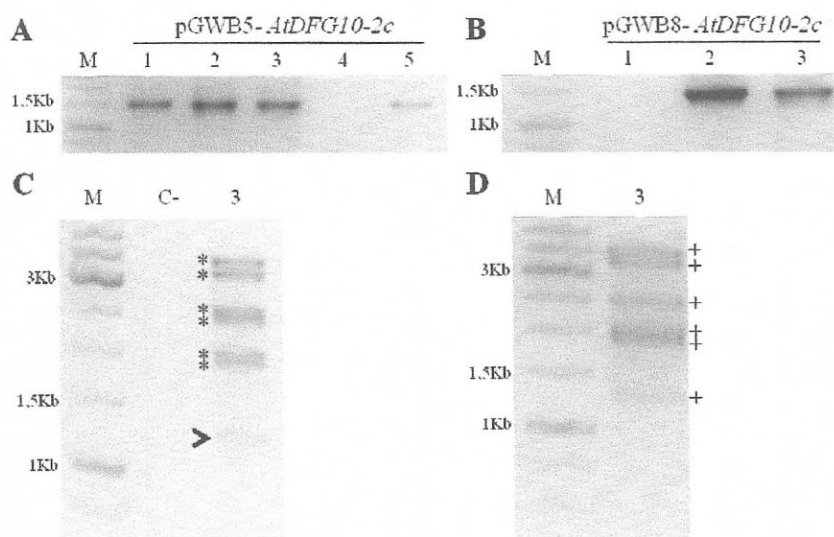


**Figura 20 – Corroboración de la subclonación de *AtDFG10-1c* en los vectores de expresión en plantas, pGWB5 y pGWB8.** **A.** Se muestra el resultado de la amplificación de *AtDFG10-1c* por PCR a las colonias de *Escherichia coli* transformadas con los vectores pGWB5-*AtDFG10-1c* y pGWB8-*AtDFG10-1c*. Las colonias utilizadas se identificaron mediante números que aparecen sobre cada carril. C<sup>+</sup>, *AtDFG10-1c* amplificado desde el cDNA total de una planta silvestre. **B.** Se muestra el resultado de la digestión enzimática de los vectores pGWB5-*AtDFG10-1c* y pGWB8-*AtDFG10-1c*, utilizando la endonucleasa HindIII. Las cabezas de flechas indican el fragmento liberado esperado para los vectores que poseen subclonado *AtDFG10-1c* en sentido con respecto a su promotor. C-, digestión sin vector. M, marcador de peso molecular.

**Tabla 11 – Patrones de digestión esperados de los vectores pGWB5 y pGWB8 que poseen subclonado *AtDFG10-1c*.**

Vector	Configuración de <i>AtDFG10-1c</i>	Tamaño de fragmentos esperados (bp)	
PGWB5- <i>AtDFG10-1c</i>	Sentido	15734	1606
	Antisentido	16106	1234
PGWB8- <i>AtDFG10-1c</i>	Sentido	15023	1610
	Antisentido	15395	1238

Se indica los tamaños esperados de la digestión de la endonucleasa HindIII en los vectores de expresión en plantas que poseen subclonado *AtDFG10-1c* tanto en sentido como en antisentido con respecto al promotor del vector.



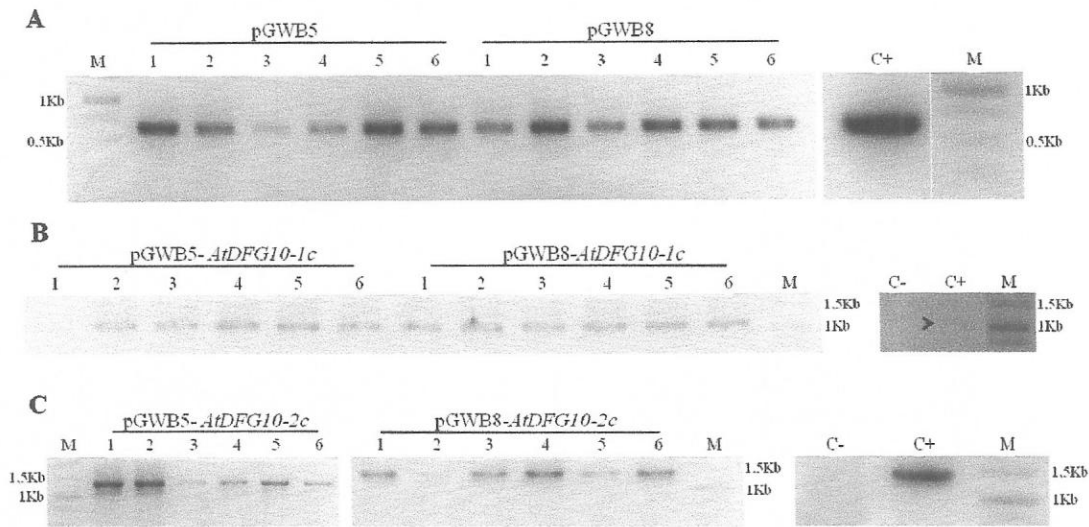
**Figura 21 – Corroboración de la subclonación de *AtDFG10-2c* en los vectores de expresión en plantas, pGWB5 y pGWB8.** A-B. Se exhibe los resultados de la amplificación de *AtDFG10-2c* en configuración sentido con respecto al promotor 35S utilizando colonias de *Escherichia coli* transformadas con los vectores pGWB5-*AtDFG10-2c* (A) y pGWB8-*AtDFG10-2c* (B). Los números de cada carril identifican diferentes clones. C-D. Se observa los resultados de la digestión enzimática de los vectores pGWB5-*AtDFG10-2c* (C) y PGWB8-*AtDFG10-2c* (D) utilizando la endonucleasa SspI. En C, la cabeza de flecha indica el fragmento liberado por el vector que posee subclonado *AtDFG10-2c* en sentido con respecto su promotor; los seis fragmentos restantes se indican en asteriscos y muestran los tamaños esperados. En D, los productos de la digestión de vector pGWB8-*AtDFG10-2c* son indicados en + y exhiben los tamaños esperados. C-, digestión sin vector. M, marcador de peso molecular.

**Tabla 12 – Patrones de digestión esperados de los vectores pGWB5 y pGWB8 que poseen subclonado *AtDFG10-2c*.**

Vector	Configuración de <i>AtDFG10-2c</i>	Tamaño de fragmentos esperados (bp)	
PGWB5- <i>AtDFG10-2c</i>	Sentido	3486; 3250; 2515; 2048; 1947	2616; 1259
	Antisentido	3486; 3250; 2515; 2048; 1947	1955; 1920
PGWB8- <i>AtDFG10-2c</i>	Sentido	3486, 3250, 2515, 2048, 1947	1968, 1348
	Antisentido	3486, 3250, 2515, 2048, 1947	1988, 1328

Se indica los tamaños esperados producidos por la digestión enzimática de la endonucleasa SspI a los vectores de expresión en plantas que poseen subclonado *AtDFG10-2c* tanto en sentido como en antisentido al promotor del vector.

Con los vectores obtenidos que poseen subclonados a *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*, se procedió a transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes, así como también con los dos vectores sin recombinar, para luego seleccionarlos con tres antibióticos de selección, Rifampicina, Gentamicina y Kanamicina. Para corroborar la transformación exitosa por cada vector ocupado, se realizó PCR a las colonias seleccionadas (Figura 22). En la Figura 22A, en todos los clones transformados se aprecia un amplificado de peso molecular entre 500 a 750pb, tamaño similar a lo obtenido en el control positivo donde se utilizó como DNA a amplificar, el vector purificado pGWB5 sin recombinar. En la Figura 22B y C, se muestra que en todas las colonias analizadas hay un amplificado único de tamaño ligeramente superior a los 1000pb para *AtDFG10-1c* (Figura 22B) e inferior a 1500pb para *AtDFG10-2c* (Figura 22C), similar a lo obtenido en los controles positivos. Los resultados indican la obtención de 6 cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformantes: cuatro cepas con uno de los vectores de expresión en plantas que contienen subclonado *AtDFG10-1c* o *AtDFG10-2c* en dirección sentido con respecto al promotor 35S y dos cepas con uno de los 2 vectores sin recombinar para usar como control.



**Figura 22 – Corroboración de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores de expresión en plantas que poseen subclonados a *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c*.** A. Resultado de la amplificación del gen de codifica para la enzima Higromicina fosfo-transferasa en colonias de *Agrobacterium* transformadas con los vectores pGWB5 y pGWB8 sin recombinar. C<sup>+</sup>, vector pGWB5 sin recombinar. B. Amplificación de *AtDFG10-1c* a colonias de *Agrobacterium* transformadas con los vectores pGWB5-*AtDFG10-1c* y pGWB8-*AtDFG10-1c*. C<sup>+</sup>, *AtDFG10-1c* amplificado de una muestra de cDNA total de una planta silvestre. C. Resultados de la amplificación de *AtDFG10-2c* en dirección sentido con respecto a su promotor a colonias de *Agrobacterium* transformadas con los vectores pGWB5-*AtDFG10-2c* y pGWB8-*AtDFG10-2c*. C<sup>+</sup>, vector pGWB8-*AtDFG10-2c*; C<sup>-</sup>, reacción sin DNA. M, marcador de peso molecular.

#### 4.3.2.- Obtención de las líneas mutantes insercionales complementadas con los marcos de lectura abiertos de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*.

Al obtener las cepas de *Agrobacterium* transformadas con los diferentes vectores de expresión en plantas, el siguiente paso en la estrategia de estudio seguida es la transformación de forma estable de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*, respectivamente (Figura 23). Para ello, se embebió la parte apical de los tallos reproductivos donde se encontraban las flores de las plantas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* de 4 semanas con los cultivos de las cepas de *Agrobacterium*

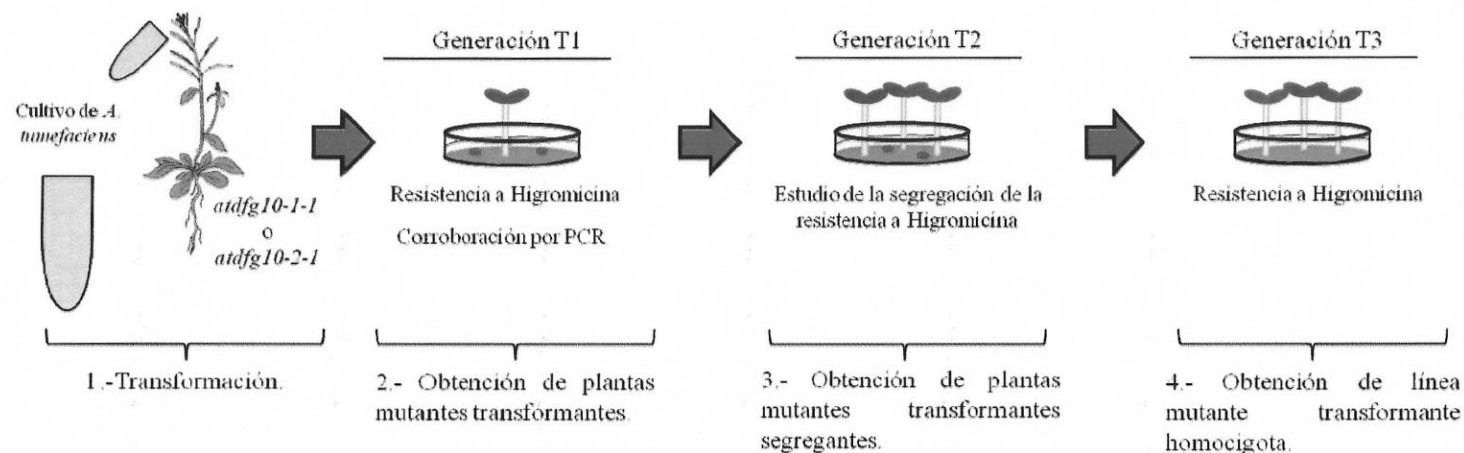
que contienen los vectores pGWB8-*AtDFG10-1c* y pGWB8-*AtDFG10-2c*, respectivamente. Además, ambas líneas mutantes se transformaron con el vector pGWB8 sin recombinar. Luego, se recolectaron las semillas provenientes de estas flores, la generación T1. Las semillas transformantes fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico Higromicina. Las plantas resistentes se genotipificaron para corroborar por PCR la presencia del fragmento que contiene los marcos de lectura abiertos de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* dentro de su genoma (Figura 24). En adelante, denominaremos a los genes introducidos 35S::*AtDFG10-1c* y 35S::*AtDFG10-2c*. En la Figura 24A, la genotipificación mediante PCR de una planta *atdfg10-1-1* transformada con el vector pGWB8-*AtDFG10-1c* (generación T1, resistente a Higromicina) que denominamos *atdfg10-1-1/35S::*AtDFG10-1**, corrobora el genotipo homocigoto mutante *atdfg10-1-1* (carriles LB1 y G1). Además, se detecta la presencia de 35S::*AtDFG10-1c* (carril S1). En la Figura 24B, la genotipificación de una planta *atdfg10-2-1/35S::*AtDFG10-2** corrobora el genotipo mutante *atdfg10-2-1* (carriles LB2 y G2) y la presencia del 35S::*AtDFG10-2c* en el genoma por la detección de un único producto (carril S2). Estos resultados indican que se obtuvo plantas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* que contienen en su genoma los genes 35S::*AtDFG10-1c* y 35S::*AtDFG10-2c*, respectivamente.

En total, se identificaron 3 plantas *atdfg10-1-1/35S::*AtDFG10-1c** y 3 plantas *atdfg10-2-1/35S::*AtDFG10-2c** (Tabla 13A). En la progenie de estas plantas, la generación T2, se analizó la segregación de la resistencia a Higromicina. Debido a que la inserción ocurre al azar es muy probable que la generación T1 posea la inserción en condición heterocigota. En este caso, la segregación de la resistencia al antibiótico sigue

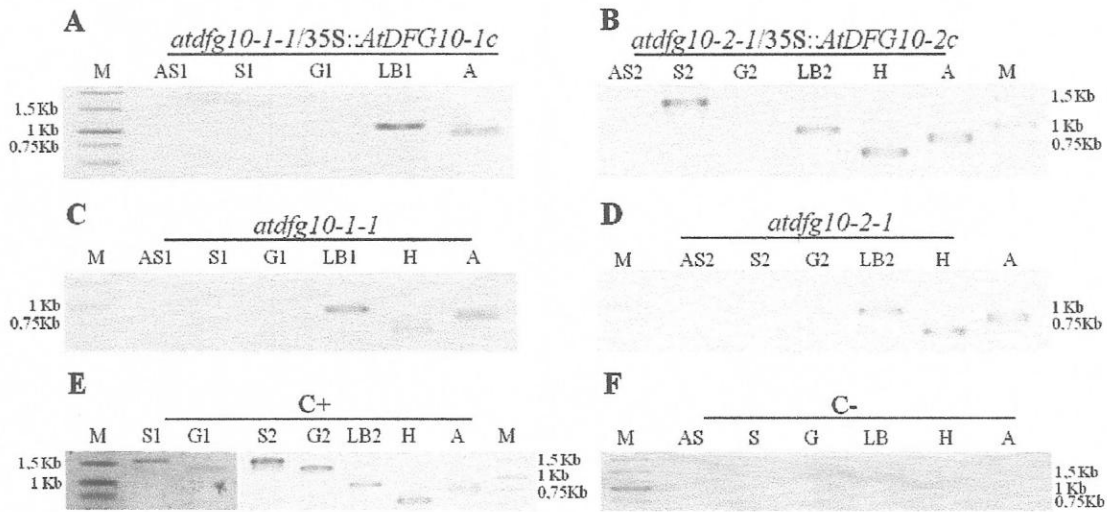
el modelo de segregación mendeliana para un carácter dominante, o sea, el 75% son plantas resistentes y el 25%, plantas sensibles. Se observa que las líneas transformantes segregan en plantas resistentes y sensibles a Higromicina en contraste con las plantas silvestres y mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* sin transformar que son 100% sensibles (Tabla 13). En la Tabla 13A se muestra el número de plantas resistentes y sensibles de las líneas *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1*, líneas *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2* y las líneas que proviene de una plantas mutantes que fueron transformadas con la cepa de *Agrobacterium* transformada con pGWB8 sin recombinar (*atdfg10-1-1/ccdb*; *atdfg10-2-1/ccdb*). Mediante un test estadístico (Prueba exacta de Fisher), se determinó que todas las progenies cumplían con la segregación esperada, excepto la progenie de la planta 1 de la línea *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* (Tabla 13A, en negritas), por lo que se decidió que no se utilizará en posteriores estudios. Estos resultados corroboran la obtención de líneas mutantes transformantes *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1*, *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2* y los controles de la transformación *atdfg10-1-1/ccdb* y *atdfg10-2-1/ccdb* que transmiten el fragmento analizado a su progenie de la manera esperada.

Es conveniente obtener plantas que presenten el fragmento transformante analizado en homocigosis, ya que se estabilizaría génicamente el fragmento transformante que contiene los genes *35S::AtDFG10s* y transmitiéndole a toda su progenie esta condición génica. Sin embargo, la genotipificación por PCR y la selección por Higromicina, no permiten distinguir las plantas homocigotas de las heterocigotas. Para obtener líneas mutantes transformantes homocigotas se tendrá que analizar la progenie de la generación T2 resistentes a la acción del antibiótico y corroborar un 100% de resistencia a Higromicina en la generación T3 (Figura 23).





**Figura 23 – Estrategia de la obtención de líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* transformadas con 35S::*AtDFG10-1c* y 35S::*AtDFG10-2c*.** Se esquematiza la estrategia para obtener plantas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* que posean en su genoma el marco de lectura abierto del gen afectado en cada mutante. 1.- La porción de la planta que contiene las inflorescencias de las plantas mutantes son embebidas con un cultivo de *Agrobacterium* transformado con el vector que integrará *AtDFG10-1c* o *AtDFG10-2c*, según corresponda. 2.- Las semillas de esta planta es la generación T1 que se seleccionan por su resistencia a Higromicina. Se corrobora en estas plantas la inserción de *AtDFG10-1c* o *AtDFG10-2c* por PCR. 3.- La progenie de las plantas T1, la generación T2, se selecciona en Higromicina para evaluar la segregación de la resistencia y con ello la de la inserción. Si la proporción de la segregación obtenida se ajusta a la esperada para plantas heterocigotas para la inserción (75% resistentes/25% sensible), se toman 6 a 10 plantas las resistentes al antibiótico. 4.- Se analiza su progenie, la generación T3 con respecto a su resistencia a Higromicina. Se selecciona la planta T2 en que el 100% de su progenie es resistente a higromicina pues se trata de una planta que tiene la inserción en la condición de homocigosis.



**Figura 24 – Corroboración de la integración del fragmento que restituye el marco de lectura de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en las líneas *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1*.** Se muestra los resultados de la genotipificación por PCR de una planta *atdfg10-1-1* y una *atdfg10-2-1* ambas resistentes a Higromicina que provienen de la transformación con la cepa de *Agrobacterium* pGWB8-*AtDFG10-1c* (A, *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c*), pGWB8-*AtDFG10-2c* (B, *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c*) y plantas *atdfg10-1-1* (C) y *atdfg10-2-1* (D) sin transformar. La presencia del fragmento de T-DNA que interrumpe los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se muestra en la reacción LB1 y LB2, respectivamente; la presencia del alelo silvestre de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* se detecta en los carriles G1 y G2, respectivamente. La presencia de los genes 35S::*AtDFG10-1c* y 35S::*AtDFG10-2c* son detectados en la reacción S1 y S2, respectivamente. La detección de los genes *AtDFG10-1c* y *AtDFG10-2c* en configuración antisentido al promotor 35S se muestra en los carriles AS1 y AS2. El carril A representa la amplificación del gen de actina para corroborar la calidad de los DNAs y el carril H, la detección del gen de codifica para la enzima Higromicina Fosfo-Transferasa. En E y F, se muestran los controles positivos (C+) y negativos (C-, sin DNA) de los correspondientes productos de PCR. En ambas plantas resistentes a Higromicina se observa la presencia del gen restituyente en configuración sentido al promotor 35S. M, marcador de peso molecular.

**Tabla 13 – Segregación de la resistencia al antibiótico Higromicina en las líneas mutantes transformantes.**

**A**

Genotipo de la línea	Planta T1	Progenie (T2)			
		Nº plantas resistentes	Nº plantas sensibles	Porcentaje de plantas resistentes	Porcentaje de plantas sensibles
<i>atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c</i>	1	9	34	21	79
<i>atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c</i>	2	11	7	61	39
<i>atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c</i>	3	36	5	88	12
<i>atdfg10-1-1/ccdb</i>	1	57	17	77	23
<i>atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c</i>	1	44	14	76	14
<i>atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c</i>	2	37	24	61	39
<i>atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c</i>	3	69	10	87	13
<i>atdfg10-2-1/ccdb</i>	1	29	22	57	43

**B**

Genotipo de las plantas	Nº plantas resistentes	Nº plantas sensibles	Porcentaje de plantas resistentes	Porcentaje de plantas sensibles
wt	0	13	0	100
<i>atdfg10-1-1</i>	0	10	0	100
<i>atdfg10-2-1</i>	0	13	0	100

Se informa el número de plantas resistentes y sensibles y su porcentaje al efecto de Higromicina de la generación T2. La evaluación de la resistencia se realizó en plantas de 10 días germinadas en medio suplementado con Higromicina 25 µg/mL. **A.** Progenie de: tres plantas T1 *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c*; tres plantas T1 *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2*, una planta T1 *atdfg10-1-1/ccdb* y una planta T1 *atdfg10-2-1/ccdb*. **B.** Controles biológicos: plantas silvestres (wt), *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* sin transformar. La proporción de todas las progenies analizadas en A se ajustaron a lo esperado (75% plantas resistentes y 25%, sensibles), excepto la progenie de la planta 1 de la línea

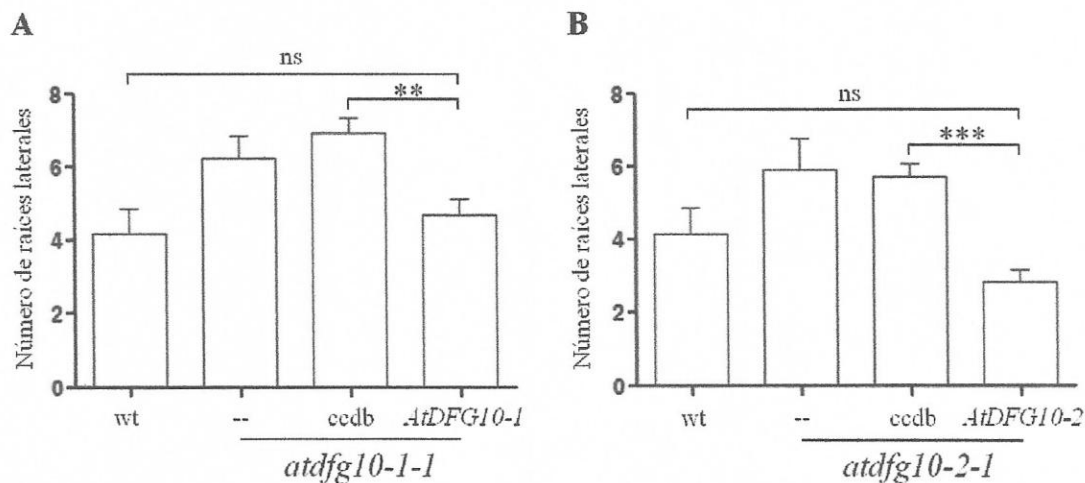
*atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* la cual está destacada en negritas (prueba exacta de Fisher,  $p < 0,05$ ).

4.3.3.- Evaluación del fenotipo de raíces laterales en las líneas *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1* y *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2*.

En el punto anterior, se determinó que las plantas de la generación T2 de la mayoría de líneas *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* y *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c* obtenidas, segregaban la resistencia al antibiótico según el modelo de segregación mendeliano para un carácter dominante. Si la función del gen interrumpido es el responsable del fenotipo observado, debiese observarse un efecto de reversión del fenotipo mutante en la planta debido a la reposición de la función génica. Anteriormente, se determinó que las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* presentan una mayor densidad radicular con respecto a las plantas silvestres, la cual se ve magnificada en la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* (Figura 13), por lo cual se espera que la restitución del gen interrumpido provoque la disminución del número de raíces laterales en las líneas mutantes transformantes en comparación a su respectiva línea mutante sin transformar y a su control biológico de transformación (*atdfg10-1-1/ccdb* y *atdfg10-2-1/ccdb*).

En la Figura 25 se muestra el resultado de la cuantificación del número de raíces laterales de las líneas *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* y *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c* y sus correspondientes controles *atdfg10-1-1/ccdb* y *atdfg10-2-1/ccdb*, junto con las líneas mutantes en los genes *AtDFG10s*. Las plantas mutantes transformantes pertenecen a la generación T2. En la Figura 24A se aprecia que la línea transformante *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* presenta una disminución estadísticamente significativa en el número de raíces laterales en comparación a la línea parental *atdfg10-1-1/ccdb*.

Interesantemente, la línea *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* presenta un número de raíces laterales comparable a lo registrado en las plantas silvestres. En la Figura 25B se observa que la línea *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c* también presenta una disminución en el número de raíces laterales en comparación a *atdfg10-2-1/ccdb* que es estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* son efectivamente los responsables del aumento en el número de raíces laterales en las líneas mutantes en los genes *AtDFG10s*. Por lo tanto, se puede determinar que la función de estos genes posee un importante papel en el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis*.



**Figura 25 – Evaluación del rescate del fenotipo de inducción de raíces laterales en las plantas *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* y *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c*.** Se muestra la cuantificación del número de raíces laterales en plántulas de 14 días post-siembra. **A.** Cuantificación de las líneas mutantes transformantes *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* (*AtDFG10-1*, N= 68) y *atdfg10-1-1/ccdb* (ccdb, N= 72) en comparación a las plantas silvestres (wt) y *atdfg10-1-1* (N= 37). **B.** Cuantificación de las líneas mutantes transformantes *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c* (*AtDFG10-2*, N= 35) y *atdfg10-2-1/ccdb* (ccdb, N= 75) en comparación a plantas silvestres (wt) y *atdfg10-2-1* (N= 22). Plantas silvestres, N=18 para A y B. Las líneas *atdfg10-1-1/35S::AtDFG10-1c* y *atdfg10-2-1/35S::AtDFG10-2c* corresponden a la generación T2. Las barras muestran el promedio del número de raíces laterales con su error estándar. Los símbolos sobre las barras indican el nivel de significancia entre dos grupos analizados: ns,  $p > 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (prueba ANOVA de una vía con posterior prueba de Tukey).

## 5.- DISCUSIÓN

### 5.1.- La función de *AtDFG10s* y su efecto en la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis thaliana*.

Dolicol es un lípido cuya biosíntesis consta de dos fases. La primera es la condensación de unidades de isopentenil pirofosfato (IPP) mediado por una cis-preniltransferasa para conformar los precursores del dolicol denominados poliprenoles (Swiezewska, E. & Danikiewicz, W. 2005). En la segunda fase de la biosíntesis de dolicol, es clave la reducción del enlace doble en el carbono  $\alpha$  de los poliprenoles, reacción que es catalizada por una poliprenol reductasa (Jones, M. & col. 2009). En levaduras, se ha vinculado a *ScDFG10* con esta actividad enzimática, basados en la abundancia de los precursores y productos de la reacción en la deficiencia de este gen. (Cantagrel, V. & col. 2010). Se ha determinado bioquímicamente que su ortólogo funcional en humanos, SRD5A3, tiene la capacidad de reducir el enlace doble de los poliprenoles (Cantagrel, V. & col. 2010).

Cabe destacar que la complementación funcional en un sistema heterólogo asume que los procesos donde participarían los productos génicos expresados en este sistema heterólogo se encuentran conservados entre ambos sistemas biológicos. La utilización de esta estrategia es válida en este estudio, ya que se ha documentado que etapas importantes dentro del proceso de la N-glicosilación de proteínas como son la biosíntesis

del lípido dolicol, la biosíntesis del árbol de N-glicano en el Retículo endoplásmico y su transferencia a la proteína blanco presentan mecanismos moleculares que se han conservado en los diferentes organismos eucariontes estudiados (Schwarz, F. & Aebi, M. 2011). También, se ha descrito que la droga Sortin2 altera el tráfico de proteínas vacuolares en los modelos de estudio de levadura y plantas (Norambuena, L. & col. 2008; Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Los resultados de esta estrategia utilizada en este trabajo convergen a una conclusión similar, lo cual valida la estrategia experimental y robustece la conclusión de estos resultados.

Los resultados de complementación funcional en la levadura mutante *dfg10Δ* indican que AtDFG10-2 tiene la capacidad de reemplazar la actividad de ScDFG10 y, por lo tanto, compartirían su función molecular, al igual que la proteína SRD5A3. AtDFG10-2 poseería por ende una actividad poliprenol reductasa, lo que es consistente con la presencia del dominio proteico 5- $\alpha$  esteroide reductasa en el extremo carboxilo terminal de su secuencia proteica, al igual que ScDFG10 (Rubilar, C. 2010). AtDFG10-1 es alrededor de un 50% similar a ScDFG10 en su secuencia aminoacídica y al igual que AtDFG10-2 posee el dominio 5- $\alpha$  esteroide reductasa. A pesar de esto, no es capaz de complementar el fenotipo de la mutante *dfg10Δ*. Es importante considerar que la biosíntesis de dolicol se realiza exclusivamente en el Retículo endoplasmático en levaduras (Jones, M. & col. 2009). Sin embargo AtDFG10-1-eGFP se localizó en los compartimentos vacuolares en levaduras por lo que es altamente probable que la versión AtDFG10-1-HA utilizada en la complementación funcional se localice también en la vacuola lo que explicaría la incapacidad de complementar la función de ScDFG10. Por su parte, el patrón de fluorescencia de AtDFG10-2-GFP muestra una distribución

subcelular muy similar a la que muestran proteínas marcadoras de Retículo endoplasmático y de peroxisomas, según la base de datos de localización subcelular de proteínas fluorescentes yeastgfp (<http://yeastgfp.yeastgenome.org/>; Huh, W. & col. 2003). Esto último refuerza que la proteína además de poseer los dominios estructurales que determinan su actividad enzimática debe localizarse en el compartimento adecuado para ser funcional. Este argumento deja abierta la posibilidad de que AtDFG10-1 sea efectivamente una poliprenol reductasa. Es importante considerar que se ha descrito que AtDFG10-1 se localiza en el Retículo endoplasmático y en el Aparato de Golgi en *A. thaliana* (Tian, G. & col. 2004; Parsons, H. & col. 2012; Tanz, S. & col. 2013). Esto apoya fuertemente que la localización subcelular de AtDFG10-1 en la levadura es inadecuada para la complementación de la función de ScDFG10 y sustenta el hecho de que su función en plantas podría estar relacionada con la biosíntesis de dolicol. La hipótesis de que AtDFG10-1 y AtDFG10-2 comparten la función molecular es respaldada por nuestros resultados respecto a la función de los genes *AtDFG10s* tanto a nivel fisiológico, a nivel del desarrollo de raíces laterales, como en la respuesta a drogas que alteran el sistema de endomembranas, Sortin2 y Tunicamicina, en *Arabidopsis*. Los resultados sugieren que ambos, *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, participarían en los mismos procesos en *Arabidopsis*. Sin embargo es importante destacar que las mutantes *atdfg10s* difieren en el efecto de Sortin2 sobre la respuesta gravitrópica radicular en la que solo *AtDFG10-2* parece tener participación. Esto indicaría que las funciones de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, si bien son similares, poseen peculiaridades a nivel fisiológico que las distinguen.



Se ha descrito que el N-glicano es una señal importante para el reconocimiento de proteínas malplegadas por chaperonas con actividad lectina que son parte del sistema residente en el Retículo endoplasmático denominado ERQC (*Endoplasmic Reticulum quality control*) que detecta la existencia de estas proteínas malplegadas, las retiene en el compartimento y permite que estas alcancen una conformación adecuada para que puedan cumplir su función en el compartimento subcelular de destino (Liu, J. & Howell, S. 2010; Roth, J. & col. 2010). Cuando ERQC es insuficiente para la demanda celular, el mecanismo ERAD (*Endoplasmic Reticulum-associated Degradation*) induce la retrotranslocación de estas proteínas al citoplasma y su degradación dependiente de la actividad del proteosoma (Kanehara, K. & col. 2007; Nakatsukasa, K. & Brodsky, J. 2008; Liu, J. & Howell, S. 2010). Cuando la tasa de síntesis de proteínas malplegadas supera la tasa de la actividad ERQC y ERAD, se produce una acumulación de proteínas malplegadas en el Retículo endoplasmático, la cual activa una serie de respuestas que en conjunto son denominadas UPR (*Unfolded Protein Response*; Iwata, Y. & Koizumi, N. 2012). Deficiencias en la N-glicosilación de proteínas induce estrés de retículo y con ello activación de UPR. Se ha descrito que la exposición de plantas silvestres al inhibidor de N-glicosilación Tunicamicina, así como también la deficiencia y ganancia de función de enzimas que participan en la biosíntesis del N-glicano presentan un aumento considerable en los niveles de transcrito de diversos genes marcadores de UPR (Martínez, I. & Chrispeels, M. 2003; Henquet, M. & col. 2008; Pattison, R. & Amtmann, A. 2008; Jadid, N. & col. 2011). En este contexto, sobre la base de la participación de los genes *AtDFG10s* en la biosíntesis de dolicol, las líneas mutantes simples de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*, y en especial la doble mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*,

podrían poseer una deficiencia en la N-glicosilación de proteínas. Estas líneas mutantes son más resistentes a Tunicamicina en comparación a las plantas silvestres al evaluar los fenotipos en el desarrollo de las plantas tratadas con este compuesto químico. Esta menor sensibilidad de las líneas mutantes puede explicarse debido al defecto en N-glicosilación de proteínas que provocaría que la respuesta UPR estuviese activada de forma constitutiva. Esto es apoyado, ya que se ha observado que líneas sobrepresoras de la enzima responsable de las primeras etapas de biosíntesis del N-glicano presentan una resistencia a Tunicamicina junto con un aumento de marcadores de UPR de forma constitutiva (Koizumi, N. & col. 1999). También, líneas que presentan UPR constitutivamente al ser expuestas a Tunicamicina, es registrada una menor inducción transcripcional de genes involucrados en UPR (Jadid, N. & col. 2011). Además se ha reportado que mutantes que tienen defectos en percibir la acumulación de proteína mal plegada y por lo tanto de establecer UPR, son más sensibles a Tunicamicina (Wang, D. & col. 2005; Nagashima, Y. & col. 2011). Para poder validar la conexión de la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* con la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis*, será necesario estudiar el perfil de glicosilación que poseen las líneas mutantes *atdfg10s* en conjunto con evaluar marcadores de UPR, además de correlacionarlo con la abundancia relativa de dolicol de las líneas *atdfg10s* en comparación a las plantas silvestres.

Es interesante observar que la mutante *atdfg10-1-1* presenta una menor sensibilidad a Tunicamicina que las plantas silvestres. Esto es un indicio que *AtDFG10-1* participaría en la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis* y que su función sería muy importante en este proceso, ya que la disminución del transcrito de *AtDFG10-1* en

*atdfg10-1-1* es de menor magnitud -20% menor con respecto a las plantas silvestres - en comparación a la pérdida de función de *AtDFG10-2* en *atdfg10-2* -disminución de transcrito a niveles no detectables -, mutante que presenta una sensibilidad similar a las plantas silvestres. Sin embargo, la doble mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* es menos sensible a Tunicamicina que las plantas silvestres y que las líneas mutantes simples, lo cual apoya a que *AtDFG10-2* también poseería un papel importante en la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis*.

Interesantemente, se ha identificado a la proteína AtDFG10-2 en la envoltura del cloroplasto (Ferro, M. & col. 2010), lo cual se contrapone a la concepción de que el proceso de N-glicosilación de proteínas se localiza en el Retículo endoplasmático, donde se ubican las enzimas que participan en la biosíntesis del N-glicano en modelos vegetales (Zhang, M. & col. 2009; Kajiura, H. & col. 2010; Farid, A. & col. 2011; Jadid, N. & col. 2011). Se ha descrito que la proteína AtDFG10-1 reside en el Retículo endoplasmático y también en el Aparato de Golgi en *A. thaliana* (Tian, G. & col. 2004; Parsons, H. & col. 2012; Tanz, S. & col. 2013). Sin embargo, podría ser que dolicol se sintetice también dentro de los plastidios, ya que en plantas se ha demostrado que las unidades de isopentenil pirofosfato (IPP) en la biosíntesis de dolicol pueden provenir tanto de la vía citoplasmática del mevalonato como de la vía plastídica del metileritritol fosfato (Skorupinska-Tudek, K. 2008; Jones, M. & col. 2009). En conjunto con esto, hay evidencia que muestra que en el cloroplasto existe condensación de unidades de IPP conformando poliprenoles (Sakaihara, T. & col. 2000). Como el cloroplasto proviene de una cianobacteria en las cuales la biosíntesis de isoprenoides ocurre exclusivamente por la vía del metileritritol fosfato (Jones, M. & col. 2009), es posible que la ruta de

biosíntesis de dolicol se haya conservado espacialmente dentro del cloroplasto y que sea un compartimiento fuente de dolicol. Esto implicaría que debería existir un flujo de este lípido en dirección al Retículo endoplasmático, lugar donde ocurre la N-glicosilación de proteínas. Existe evidencia que postula que los cis-poliprenoides sintetizados en los cloroplastos son elongados en el Retículo endoplasmático (Skorupinska-Tudek, K. & col. 2008) y que existe flujo de lípidos desde el cloroplasto al Retículo endoplasmático presumiblemente por contacto directo entre ambos compartimientos (Griffing, L. 2011). Esta interesante propuesta podría explicar la importancia aparentemente secundaria de *AtDFG10-2* en comparación a *AtDFG10-1* en la sensibilidad de las mutantes *atdfg10s* a Tunicamicina. A su vez, explicaría por qué la pérdida de función de *AtDFG10-2* posee un efecto comparable a la pérdida de función solo parcial de *AtDFG10-1* en las mutantes *atdfg10s* tanto a nivel de su fenotipo radicular como en su respuesta a Sortin2.

Por otra parte, la línea mutante con pérdida de función de una cis-preniltransferasa específica de plantas, *lew1*, presenta una drástica disminución de dolicol y es más sensible a Tunicamicina (Zhang, H. & col. 2008). Esta aparente contradicción con lo planteado podría estar explicada por el efecto en el tráfico proteico que provocaría la disminución en la cantidad de poliprenoides. Se ha reportado que la mutante *rer2* en levaduras que presenta una disminución drástica en la actividad cis-preniltransferasa y deficiencias en la N-glicosilación de proteínas, exhibe alteraciones exclusivas que no fueron detectados en mutantes relacionadas a la N-glicosilación de proteínas, inclusive en la cepa que posee alterada la actividad enzimática de la enzima que cataliza la formación de dolicol fosfato, el aceptor lipídico del primer monosacárido, la N-acetil glucosamina fosfato, para formar el N-glicano (Sato, M. & col. 1999). Una de

estas alteraciones es el defecto en la retención de proteínas del Retículo endoplasmático como, por ejemplo, la chaperona BiP que participa en UPR (Sato, M. & col. 1999; Liu, J. & Howell, S. 2010). Por consiguiente, se ha propuesto que los polisoprenoides poseen un papel importante en regular el tráfico intracelular de proteínas, en especial en la retención de las proteínas residentes del Retículo endoplasmático (Surmacz, L. & Swiezewska, E. 2011). La fuga de proteínas residentes del Retículo endoplasmático, en especial de BiP, podría estar ocurriendo en la mutante *lew1*, lo que disminuiría la abundancia de BiP en el Retículo Endoplasmático y por ende habría una menor probabilidad de que las proteínas alcancen su estado de plegamiento correcto, explicando la mayor sensibilidad a Tunicamicina. Interesantemente, el colapso foliar que caracteriza a las plantas *lew1* también se observa en las plantas *bip2* (Wang, D. & col. 2005; Zhang, H. & col. 2008). A pesar que este fenotipo no se detectó en las líneas mutantes *atdfg10s*, no se puede descartar la secreción de proteínas residentes del Retículo en estas líneas mutantes. Los niveles relativos de dolicol esperados para las mutantes en los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* serían mayores al reportado en *lew1*, la cual presenta una disminución de un 85% con respecto a las plantas silvestres (Zhang, H. & col. 2008), basados en que la pérdida de función de *AtDFG10-1* fue solo parcial. Además, hay que considerar que en las mutantes *atdfg10s*, el gen *AtDFG10-3* podría suplir en parte la función de los genes interrumpidos por el T-DNA. Aunque su función aun no ha sido determinada es altamente probable que aporte en la biosíntesis de dolicol debido a que el porcentaje de similitud aminoacídica a ScDFG10 es comparable al exhibido por *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2*. Por consiguiente, la hipotética fuga de

proteínas residentes del Retículo endoplasmático en las líneas mutantes en los genes *AtDFG10s* analizados podría ser mucho menos severa.

#### 5.2.- Implicancias de la función de *AtDFG10s* en la ruta endocítica y la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

En estudios independientes a los que describen la función de *ScDFG10* dentro del proceso de la N-glicosilación de proteínas, se asoció la función de este gen como importante en la acción que posee el compuesto químico Sortin2 en levaduras, surgiendo como un candidato a ser un blanco molecular de Sortin2 (Norambuena, L. resultados no publicados). Específicamente nuestro laboratorio tiene evidencias de que *ScDFG10* es necesario para que Sortin2 induzca la secreción de la proteína vacuolar CPY y acelere la endocitosis en *Saccharomyces*. Sin embargo, se desconoce el mecanismo que utiliza el compuesto para producir los efectos en el tráfico intracelular. Si *ScDFG10* es un blanco molecular de Sortin2, un posible mecanismo de acción podría ser que Sortin2 inhibiera específicamente la actividad enzimática de *ScDFG10* y por consiguiente, la abundancia de dolicol disminuyera, lo cual afectaría el tráfico intracelular. Hay evidencia que apunta a que la disminución en la cantidad de los poliprenoides altera el tráfico intracelular de proteínas (Sato, M. & col. 1999; Surmacz, L. & Swiezewska, E. 2011). En este caso, se esperaría que la cepa *dfg10Δ* presentara una secreción constitutiva de CPY al medio extracelular, lo cual no se observa en los ensayos que realizamos en este trabajo por lo que podemos descartar esta posibilidad. Por el contrario, si Sortin2 estimulara la actividad de *ScDFG10*, se produciría eventualmente un aumento en la abundancia de dolicol, causando alteración en la ruta secretoria y podría explicar la resistencia de la

cepa *dfg10Δ* a la acción celular de Sortin2. Sin embargo, ScDFG10 es un gen único en *Saccharomyces*, por lo tanto la mutante delecional *dfg10Δ* debería ser insensible al efecto de Sortin2, lo cual no es lo observado. Como existe evidencia de que AtDFG10s conservan la función celular de ScDFG10, entonces se esperaría que los AtDFG10s participaran de manera indirecta en la acción de Sortin2 en *Arabidopsis* al igual que ScDFG10 en *Saccharomyces*.

Se ha reportado que Sortin2 en *Arabidopsis*, al igual que en levaduras, induce la secreción de CPY y acelera el tráfico endocítico hacia la vacuola (Zouhar, J. & col. 2004; Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Interesantemente, al examinar la ruta endocítica en las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* bajo tratamientos con Sortin2, no se observó la aceleración del tráfico endocítico observado en las plantas silvestres. Esto indica que las líneas mutantes son más resistentes al efecto acelerador de la ruta endocítica de Sortin2. Estos antecedentes sugieren que la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* es requerida para la acción de Sortin2 en *Arabidopsis* a nivel celular, al igual que lo observado en *Saccharomyces*. Por la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis*, factor importante, entre otras funciones, en la correcta destinación de proteínas, es plausible pensar que en las mutantes con pérdida de función en los genes *AtDFG10s*, un componente molecular que se requiera para el tráfico hacia la vacuola se encuentre localizado erróneamente y, por consiguiente, esta alteración otorgue una resistencia o menor sensibilidad al efecto de Sortin2 en la aceleración del tráfico endocítico hacia este compartimiento. Si esta hipótesis es cierta, el blanco molecular de Sortin2 es sensible a la modulación que ejerce la N-glicosilación de proteínas, probablemente en su actividad

y/o en su localización subcelular. Se podría tratar de una glicoproteína que vea afectada su localización subcelular al modularse la N-glicosilación de proteínas. Para evaluar esta posibilidad, podría ser muy útil evaluar el tráfico de proteínas reguladoras del tráfico endocítico a nivel de los endosomas, como por ejemplo, las proteínas Rab ARA6 y ARA7 en las líneas mutantes *atdfg10s* para pesquisar si existen alteraciones en su localización subcelular.

Recientemente, la acción celular de Sortin2 se ha correlacionado con su efecto fisiológico en plantas, la inducción de raíces laterales (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Se observó que Sortin2 altera el tráfico a compartimientos prevacuolares y la vacuola (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Interesantemente, la inducción de raíces laterales dependiente de Sortin2 requiere del tráfico celular entre compartimientos prevacuolares y la vacuola que es inhibido por Wortmanina (Matsuoka, K. & col. 1995; Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Estos antecedentes sugieren que el blanco celular de Sortin2 en la ruta endocítica de *Arabidopsis* trafica entre los endosomas tempranos y los endosomas tardíos/compartimientos prevacuolares y que la modulación de este tráfico es un prerrequisito en la formación de raíces laterales. La función de los genes *AtDFG10s* participa en la formación de raíces laterales en *Arabidopsis*, ya que su pérdida de función causa un aumento en la formación de estos órganos vegetales. Sin embargo, las líneas mutantes simples *atdfg10s* son sensibles a la inducción en la formación de raíces laterales dependiente de Sortin2, lo cual contradice su resistencia a nivel celular frente a este compuesto. Esto sugiere que existe un mecanismo alternativo a la inducción del tráfico endocítico tardío, el cual es dependiente de Sortin2 en la formación de raíces laterales. Este mecanismo alternativo puede ser la modulación positiva de la tasa



endocítica, ya que la inhibición química de la endocitosis dependiente de clatrina utilizando Tirfostina A23, disminuye de forma significativa la formación de raíces laterales (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). También, se ha descrito que Sortin2 revierte el efecto de Tirfostina A23 en cuanto a la formación de raíces laterales, pero no puede ejercer esta acción en coincidencia con Wortmanina (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012), compuesto que también inhibe la endocitosis desde la membrana plasmática en *Arabidopsis* (Beck M. & col., 2012; Ito E. & col., 2012). Además, analizando con mayor profundidad los resultados, se puede detectar también un aumento cualitativo del número de endosomas, reflejado en un aumento de las estructuras punteadas FM4-64 positivas tanto en las plantas silvestres como en las mutantes simples *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* tratadas con Sortin2.

Está ampliamente descrito que la formación de raíces laterales es inducida por la hormona auxina específicamente por efecto de la regulación transcripcional mediada por su receptor intranuclear, el complejo proteico SCF<sup>TIR</sup> y componentes moleculares que determinan la abundancia de represores transcripcionales (Paciorek, T. & Friml, J. 2006; Péret, B. & col. 2009). Sin embargo, Sortin2 induce la formación de raíces laterales por una vía de señalización independiente de la mediada por SCF<sup>TIR</sup> (Pérez-Henríquez, P. & col. 2012). Dado que Sortin2 modularía tanto la tasa de endocitosis como el tráfico hacia la vacuola, se propone que la acción de este compuesto fenocopiaría el proceso de endocitosis mediada por la activación de un receptor o similar con un papel importante en la formación de raíces laterales que aun no se ha determinado. Cabe mencionar que el proceso de endocitosis mediada por la activación de un receptor se ha reportado en *Arabidopsis* como un mecanismo que determina una regulación transcripcional de genes

que participan en la respuesta al ligando (Robatzek, S. & col. 2006; Geldner, N. & col. 2007). Se infiere entonces que un aumento en la tasa de endocitosis de componentes señalizadores presentes en la membrana plasmática jugaría también un papel importante en la formación de raíces laterales dependiente de una vía de transducción de señal. Esta propuesta supone un modelo donde la modulación de la tasa endocítica y la maduración endosomal son partes importantes en la vía de señalización participantes en la formación de raíces laterales independiente de SCF<sup>TIR</sup>. Es interesante notar que la línea mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* presenta una densidad radicular comparable al que exhiben las plantas silvestres tratadas con Sortin2. Las líneas mutantes *atdfg10-1-1* y *atdfg10-2-1* presentan resistencia al efecto de Sortin2 a nivel del tráfico endocítico hacia la vacuola, por lo que es plausible proponer que la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* presentaría además una mayor tasa de endocitosis de forma constitutiva en comparación a la de las plantas silvestres y las líneas mutantes simples para explicar la mayor formación de raíces laterales. Hay que considerar que la alteración en la N-glicosilación de proteínas en la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* provocaría una disminución en la abundancia de dolicol. Esto podría tener un impacto importante en la tasa endocítica si existieran N-glicoproteínas que fuesen requeridas para el proceso endocítico y/o su regulación. Un candidato molecular puede ser el receptor de auxina ABP1 (*Auxin-binding protein 1*) que presenta dos sitios de N-glicosilación en su secuencia proteica. Este receptor se encuentra en dos poblaciones, localizado en el Retículo endoplasmático y/o en el apoplasto al cual llega traficando por la ruta secretoria (Robert, S. & col. 2010). ABP1 se encuentra asociado a la membrana plasmática regulando positivamente la endocitosis mediada por clatrina, proceso inhibido al unir auxina (Robert, S. & col. 2010). Como se

acepta que el plegamiento de proteínas con un mayor número de N-glicanos es dependiente de la correcta N-glicosilación de proteínas (Helenius, A. & Aebi, M. 2004) y en comparación a otras glicoproteínas, ABP1 presenta pocos sitios de N-glicosilación, solo dos sitios en comparación a los 17 sitios que presenta, por ejemplo, el receptor de la hormona brasinoesteroides BRI1 (N-GlycoSite, [www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html), Zhang, M. & col. 2004), por lo tanto, ABP1 podría alcanzar su configuración óptima aun careciendo de N-glicanos. En consecuencia, en las líneas mutantes simples y en especial en la línea *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1*, se podría ver afectada la N-glicosilación de ABP1 sin afectar su plegamiento. En estas condiciones, un mayor flujo de ABP1 funcional sería secretado a la membrana plasmática debido a que los mecanismos de ERQC serían incapaces de retener a ABP1 en el Retículo endoplasmático, lo que induciría una mayor tasa de endocitosis. Esto explicaría por qué la línea mutante *atdfg10-1-1/atdfg10-2-1* fenocopia los efectos de Sortin2 en *Arabidopsis* en la formación de raíces laterales.

Complementando a lo discutido anteriormente, el efecto de la deficiencia en la N-glicosilación puede ser relacionado directamente también con la hormona citoquinina, la cual regula negativamente la organogénesis radicular (Werner, T. & col. 2003; Laplaze, L. & col. 2007; Bielach, A. & col. 2012; Petricka, J. & col. 2012). Los receptores de esta hormona poseen entre 5 a 8 sitios de N-glicosilación (N-GlycoSite, [www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html)) y se encuentran localizados tanto en la membrana plasmática como en el Retículo endoplasmático (Hwang, I. & col. 2012). Recientemente se ha reportado que el tráfico endocítico hacia la vacuola del facilitador del transporte de auxina PIN1, es mediado por la activación de

los receptores de citoquinina, efecto que es independiente de la regulación transcripcional que ejerce esta hormona en *Arabidopsis* (Marhavý, P. & col. 2011). Estas evidencias sugieren una cercanía funcional entre el tráfico endocítico y la regulación de la N-glicosilación de proteínas que trafican por el Sistema de endomembranas, procesos que se verían afectados en las líneas mutantes *atdfg10s*.

En resumen, este trabajo vincula la N-glicosilación de proteínas con la modulación del tráfico endocítico involucrado en el desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis*. Según la bibliografía revisada, no hay referencias hasta este momento que relacionen ambos procesos celulares ni tampoco su impacto en la formación de raíces laterales. Por ende, se necesita investigar más profundamente para comprobar de manera certera este interesante vínculo.

### 5.3.- Impacto de la función de *AtDFG10s* en la fisiología de *Arabidopsis thaliana*.

Se ha reportado que la deficiencia en la N-glicosilación de proteínas produce efectos muy severos en los organismos eucariontes. En el caso de humanos, la deficiencia de dolicol origina síndromes muy graves que causan la muerte a temprana edad (Kranz, C. & col. 2007; Cantagrel, V. & col. 2010; Cantagrel, V. & Lefebel, D. 2011). A su vez, la inhibición del proceso mediada por Tunicamicina es letal en todos los organismos eucariontes estudiados (Pattison, P. & Amtmann, A. 2008). Sin embargo, se ha reportado que mutaciones que afectan la síntesis del N-glicano en plantas pueden tanto incidir gravemente en el desarrollo vegetal, como también, no observarse cambios severos en el organismo (Pattison, P. & Amtmann, A. 2008; Zhang, H. & col. 2008; Kajiura, H. & col. 2010; Jadid, N. & col. 2011). Las líneas mutantes *atdfg10s*, si bien

presentan una alteración en la formación de raíces laterales, no presentan otros defectos apreciables a nivel de desarrollo de órganos o crecimiento. De hecho, es sorprendente que las mutantes *atdfg10s* mantengan sus características fisiológicas a pesar de tener afectado un proceso que podría tener un efecto pleiotrópico y severo como se observa al inhibir con compuestos químicos la N-glicosilación de proteínas que incluso puede ser letal (Jadid, N. & col. 2011). Considerando que en las mutantes *atdfg10s* la pérdida de función de los genes es parcial, además, el alelo silvestre de *AtDFG10-3* se encuentra inalterado, es posible que el efecto de la pérdida de función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* en el desarrollo sea solo sobre los procesos biológicos más sensibles. Un efecto similar podría suceder si se aplicara bajas dosis de Tunicamicina, lo cual sería útil evaluar.

Por último, una perspectiva interesante de abordar a futuro es la influencia de la función de los genes *AtDFG10s* en la respuesta a estrés ambiental tanto biótico como abiótico. Se ha reportado que la infección por patógenos induce un aumento de los transcritos de genes relacionados en la N-glicosilación de proteínas y genes participantes en ERQC, además de que la pérdida de función en componentes del ERQC presentan una respuesta a patógenos defectuosa (Wang, D. & col. 2005). A su vez, se ha observado que el estrés por alta concentración de sales y por shock térmico modula la activación de receptores de proteína malplegada y por ende UPR (Liu, J. & col. 2007; Deng, Y. & col. 2011). Se esperaría que las mutantes en los genes *AtDFG10s* fueran más resistentes al estrés salino en concordancia a lo que se ha reportado en líneas mutantes deficientes en la N-glicosilación de proteínas que presentan una respuesta alterada a este tipo de estrés (Koiwa, H. & col. 2003; Farid, A. & col. 2011).

## 6.- CONCLUSIONES

1.- AtDFG10-2 comparte la misma función molecular de ScDFG10. Por lo tanto, es probable que esté involucrado en la biosíntesis de dolicol y por ende, poseería un rol importante en la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis thaliana*.

2.- La función de *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* es importante para la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

3.- Los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* son requeridos en la formación de raíces laterales inducido por Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*, probablemente por la aceleración del tráfico endocítico.

4.- Las líneas mutantes de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* son menos sensibles al efecto del inductor de UPR, Tunicamicina. Esto sugiere un vínculo entre la función de los genes *AtDFG10-1* y *AtDFG10-2* y la N-glicosilación de proteínas en *Arabidopsis thaliana*.

5.- Se sugiere fuertemente un vínculo entre la N-glicosilación de proteínas y la modulación del tráfico endocítico dependiente de Sortin2 involucrado en el desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell. Ch. 10, 12 & 13. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 5<sup>o</sup> edition.
2. Alonso, J., Stepanova, A., Leisse, T., Kim, C., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. & Beyy, F. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301: 653 – 657.
3. Assaad, F., Qiu, J., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S., Edwards, H., Ramonell, K., Somerville, C. & Thordal-Christensen, H. 2004. The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Molecular Biology of the Cell*. 15: 5118–5129
4. Bassham, D., Brandizzi, F., Otegui, M. & Sanderfoot, A. 2008. The secretory system of *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book*. 6. 1- 29.
5. Beck, M., Zhou, J., Faulkner, C., MacLean, D. & Robatzek, S. Spatio-Temporal Cellular Dynamics of the Arabidopsis Flagellin Receptor Reveal Activation Status-Dependent Endosomal Sorting. *The Plant Cell*. 24: 4205-4219.
6. Bielach, A., Podlesáková, K., Marhavý, P., Duclercq, J., Cuesta, C., Müller, B., Grunewald, W., Tarkowski, P. & Benková, E. 2012. Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in Arabidopsis by cytokinin. *The Plant Cell*. 24: 3967 – 3981.
7. Cantagrel, V., Lefeber, D., Ng, B., Guan, Z., Silhavy, J., Bielas, S., Lehle, L., Hombauer, H., Adamowicz, M., Swiezewska, E., De Brouwer, A., Blümel, P., Sykut-Cegielska, J., Houliston, S., Swistun, D., Ali, B., Dobyns, W., Babovic-Vuksanovic, D., van Bokhoven, H., Wevers, R., Raetz, C., Freeze, H., Morava, É., Al-Gazali, L. & Gleeson, J. 2010. SRD5A3 Is Required for Converting Polyprenol to Dolichol and Is Mutated in a Congenital Glycosylation Disorder. *Cell*. 142: 203 – 217.
8. Cantagrel, V. & Lefeber, D. 2011. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases. *Journal of Inherited Metabolism Disease*. 34: 859 – 867.
9. Chen, J., Ullah, H., Young, J., Sussman, M. & Jones, A. 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes & Development*. 15: 902 – 911.
10. Chen, J., Stefano, G., Brandizzi, F. & Zheng, H. 2011. Arabidopsis RHD3 mediates the generation of the tubular ER network and is required for Golgi distribution and motility in plant cells. *Journal of Cell Science*. 124: 2241 – 2252.

11. De Smet, I. & Beeckman, T. 2011. Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. *Molecular Cell Biology*. 12: 177 – 189.
12. Deng, Y., Humbert, S., Liu, J., Rothstein, S. & Howell, S. 2011. Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *PNAS*. 108: 7247 – 7252.
13. Dettmer, J. & Friml, J. 2011. Cell polarity in plants: when two do the same, it is not the same... *Current opinion in cell biology*. 23: 686 – 696.
14. Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y., Robinson, D. & Jiang, L. 2012. Unconventional protein secretion. *Trends in Plant Science*. 17, 10: 606 – 615.
15. Drakakaki, G., Robert, S., Szatmari, A., Brown, M., Nagawa, S., van Damme, D., Leonard, M., Yang, Z., Schmid, S., Russinova, E., Friml, J., Raikhel, N. & Hicks, G. 2011. Clusters of bioactive compounds target dynamic endomembrane networks in vivo. *PNAS*. 108, 43: 17850 – 17855.
16. Farid, A., Pabst, M., Schoberer, J., Altmann, F., Glössl, J. & Strasser, R. 2011. *Arabidopsis thaliana* alpha1,2-glucosyltransferase (ALG10) is required for efficient N-glycosylation and leaf growth. *The Plant Journal*. 68: 314 – 325.
17. Ferro, M., Brugière, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellat, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C. & Rolland, N. 2010. AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope protein. *Molecular & Cellular proteomics*. 9, 6: 1063 – 1084.
18. Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. & Jurgens, G. 2003. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport and auxin-dependent plant growth. *Cell*. 112, 2:219 – 230.
19. Geldner, N., Hyman, D., Wang, X., Schumacher, K. & Chory, J. 2007. Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes & Development*. 21: 1598 – 1602.
20. Gibeaut, D., Hulett, J., Cramer, G. & Seemann, J. 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiology*. 115: 317 – 319.
21. Griffing, L. 2011. Laser stimulation of the chloroplast/endoplasmic reticulum nexus in tobacco transiently produces protein aggregates (boluses) within the endoplasmic reticulum and stimulates local ER remodeling. *Molecular Plant*. 4, 5: 886 – 895.
22. Helenius, A. & Aebi, M. 2004. Roles of N-linked glycans in the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Chemistry*. 73: 1019 – 1049.
23. Henquet, M., Lehle, L., Schreuder, M., Rouwendal, G., Molthoff, J., Helsper, J., van der Krol, S. & Bosch, D. 2008. Identification of the gene encoding the alpha1,3-mannosyltransferase (ALG3) in *Arabidopsis* and characterization of the downstream N-glycan processing. *The Plant Cell*. 20: 1652 – 1664.
24. Hicks, G. & Raikhel, N. 2012. Small Molecules Present Large Opportunities in Plant Biology. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 13.1 – 13.22.



25. Hong, Z., Jin, H., Tzfira, T. & Li, J. 2008. Multiple Mechanism-Mediated Retention of a Defective Brassinosteroid Receptor in the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis. *The Plant Cell*. 20: 3418 – 3429.
26. Huh, W., Falvo, J., Gerke, L., Carroll, A., Howson, R., Weissman, J & O'Shea, E. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. 686 – 691.
27. Hwang, I., Sheen, J. & Müller, B. 2012. Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 353 – 380.
28. Iwata, Y. & Koizumi, N. 2012. Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends in Plant Science*. 17, 12: 720 – 727.
29. Ito, E., Fujimoto M., Ebine1, K., Uemura T., Ueda T. & Nakano A. 2012. Dynamic behavior of clathrin in Arabidopsis thaliana unveiled by live imaging. *The Plant Journal*. 69: 204 – 216.
30. Jadid, N., Mialoundama, A., Heintz, D., Ayoub, D., Enhardt, M., Mutterer, J., Meyer, D., Alioua, A., van Dorsselaer, A., Rahier, A., Camara, B. & Bouvier, F. 2011. Dolichol phosphate mannose synthase1 mediates the biogenesis of isoprenyl-linked glycans and influences development, stress responses and ammonium hypersensitivity in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 23: 1985- 2005.
31. Jolliffe, N., Craddock, C. & Frigerio, L. 2005. Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochemical society transactions*. 33: 1016 – 1018.
32. Jones, M., Rosenberg, J., Betenbaugh, M. & Krag, S. 2009. Structure and synthesis of polyisoprenoids used in N-glycosylation across the three domains of life. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1970: 485 - 494
33. Jürgens, G. 2005. Cytokinesis in higher plants. *Annual Review in plant biology*. 56: 281 – 299.
34. Kajiura, H., Seki, T. & Fujiyama, K. 2010. *Arabidopsis thaliana* ALG3 mutant synthesizes immature oligosaccharides in the ER and accumulates unique N-glycans. *Glycobiology*. 20, 6: 736 – 751.
35. Kanehara, K., Kawaguchi, S. & Ng, D. 2007. The EDEM and Yos9p families of lectin-like ERAD factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 743 – 750.
36. Kleine-Vehna, J., Langowskia, L., Wisniewskab, J., Dhonuksheb, P., Brewerb, P. & Friml, J. 2008. Cellular and Molecular Requirements for Polar PIN Targeting and Transcytosis in Plants. *Molecular Plant*. 1, 6: 1056 – 1066.
37. Koiwa, H., Li, F., McCully, M., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., Nakagawa, Y., Zhu, J., Rus, A., Pardo, J., Bressan, R. & Hasegawa, P. 2003. The STT3a Subunit inoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *The Plant Cell*. 15: 2273 – 2284.
38. Koizumi, N., Ujino, T., Sano, H. & Chrispeels, M. 1999. Overexpression of a gene that encodes the first enzyme in the biosynthesis of asparagines-linked glycans makes plants resistant to tunicamycin and obviates the tunicamycin-induced unfolded protein response. *Plant Physiology*. 121: 353 – 361.
39. Kranz, C., Jungeblut, C., Denecke, J., Erlekotte, A., Sohlbach, C., Debus, V., Kehl, H., Harms, E., Reith, A., Reichel, S., Grobe, H., Hammersen, G., Schwarzer, U., Marquardt, T. 2007. A defect in dolichol phosphate biosynthesis causes a new inherited disorder with death in early infancy. *The American Journal of Human Genetics*. 80: 433 – 440.

40. Laplaze, L., Benková, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodríguez, M., Offringa, R., Graham, N., Douas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T. & Bennett, M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cell
41. Lipka, V., Kwon, C. & Panstruga, R. 2007. SNARE-ware: The role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 23: 147 – 174.
42. Liu, J., Srivastava, R., Che, P. & Howell, S. 2007. Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal*. 51: 897 – 909.
43. Liu, J. & Howell, S. 2010. Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control and Its Relationship to Environmental Stress Responses in Plants. *The Plant Cell*. 22: 2930 – 2942.
44. Lukowitz, W., Mayer, U. & Jürgens, G. 1996. Cytokinesis in the Arabidopsis Embryo Involves the Syntaxin-Related KNOLLE Gene Product. *Cell*. 84: 61 – 71.
45. Lycett, G. 2008. The role of Rab GTPases in cell wall metabolism. *Journal of experimental botany*. 59: 4061 – 4074.
46. Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Parezová, M., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J. & Benková, E. 2011. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell*. 21: 796 – 804.
47. Martínez, I. & Chrispeels, M. 2003. Genomic Analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *The Plant Cell*. 15: 561 – 576.
48. Matheson, L., Hanton, S. & Brandizzi, F. 2006. Traffic between the plant endoplasmic reticulum and Golgi apparatus: to the Golgi and beyond. *Current opinion in plant biology*. 9: 601 – 609.
49. Matsui, T., Takita, E., Sato, T., Kijjo, S., Aizawa, M., Sugiura, Y., Hamabata, T., Sawada, K. & Kato, K. 2011. N-glycosylation at noncanonical Asn-X-Cys sequences in plant cells. *Glycobiology*. 21, 8: 994 – 999.
50. Matsuoka, K., Bassham, D., Raikhel, N. & Nakamura, K. 1995. Different sensitivity to Wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *Journal of Cell Biology*. 130: 1307 – 1318.
51. Men, S., Boutté, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y., Hartmann, M., Moritz, T. & Grebe, M. 2008. Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nature Cell Biology*. 10: 237 – 244.
52. Moreau, P., Brandizzi, F., Hanton, S., Chatre, L., Melser, S., Hawes, C. & Satiat-Jeunemaitre, B. 2007. The plant ER–Golgi interface: a highly structured and dynamic membrane complex. *The journal of experimental Botany* 58: 49 – 64
53. Mösch, H. & Fink, G. 1997. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 145: 671 – 684
54. Nakatsukasa, K. & Brodsky, J. 2008. The recognition and retrotranslocation of misfolded protein from the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*. 9, 6: 861 – 870.
55. Nagashima, Y., Mishiba, K., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y. & Koizumi, N. 2011. Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of *bZIP60* mRNA to produce the active transcription factor. *Scientific reports*. 1, 29.

56. Nebenführ, A. & Staehelin, A. 2001. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends in Plant Science*. 6: 160 – 167.
57. Nicchitta, C. 2002. A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER. *Current Opinion in Cell Biology*. 14: 412 – 416.
58. Norambuena, L., Zouhar, J., Hicks, G. & Raikhel, N. 2008. Identification of cellular pathways affected by Sortin2, a synthetic compound that affects protein targeting to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Chemical Biology*. 8: 1 – 8.
59. Paciorek, T. & Friml, J. 2006. Auxin signaling. *Journal of Cell Science*. 119, 7: 1199 – 1202.
60. Parsons, H., Christiansen, K., Knierim, B., Carroll, A., Ito, J., Batth, T., Smith-Moritz, A., Morrison, S., McInerney, P., Hadi, M., Auer, M., Mukhopadhyay, A., Petzold, C., Scheller, H., Loqué, D. & Heazlewood, J. 2012. Isolation and proteomic characterization of the Arabidopsis Golgi defines functional and novel components involved in plant cell wall biosynthesis. *Plant Physiology*. 159: 12 -26.
61. Pattison, P. & Amtmann, A. 2008. N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. *Trends in Plant Science*. 14, 2: 92 – 99.
62. Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beekman, T. & Bennett, M. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trend in Plant Science*. 14,7: 399 – 408.
63. Pérez, P. 2009. Análisis del efecto de Sortin2 en la respuesta a auxinas y en el sistema de endomembranas en *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
64. Pérez-Henríquez, P., Raikhel, N. & Norambuena, L. 2012. Endocytic Trafficking towards the Vacuole Plays a Key Role in the Auxin Receptor SCFTIR-Independent Mechanism of Lateral Root Formation in *A. thaliana*. *Molecular Plant*. 5,6: 1195 – 1209.
65. Petrášek, J. & Friml, J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development*. 136: 2675 – 2688.
66. Petricka, J., Winter, C. & Benfey, P. 2012. Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 24.1 – 24.28.
67. Reyes, F., Buono, R. & Otegui, M. 2011. Plant endosomal trafficking pathways. *Current opinion in plant biology*. 14: 666 – 673.
68. Richter, S., VoB, U. & Jürgens, G. 2009. Post-Golgi traffic in plants. *Traffic*. 10: 819 - 828.
69. Robatzek, S., Chinchilla, D. & Boller, T. 2006. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes & Development*. 20: 537 – 542.
70. Robert, S., Chary, S., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N. & Hicks, G. 2008. Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *PNAS*. 105: 8464 – 8469.
71. Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paclorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Covanová, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S., Jones, A., Luschnig, C., Aniento, F., Zazimalová, E. & Friml, J. 2010. ABP1 mediates auxin inhibition of Clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell*. 143: 111 – 121.

72. Robinson, D., Jiang, L. & Schumacher, K. 2008. The endosomal system of plant: Charting new and familiar territories. *Plant physiology*. 147: 1482 – 1492.
73. Rojo, E., Gillmor, C., Kovaleva, V., Somerville, C. & Raikhel, N. 2001. VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. 1: 303 – 310
74. Roth, J., Zuber, C., Park, S., Jang, I., Lee, Y., Kysela, G., Le Fourn, V., Santimaria, R., Guhl, B. & Cho, J. 2010. Protein N-glycosylation, protein folding and protein quality control. *Molecules and Cells*. 30: 497 – 506.
75. Rubilar, C. 2010. Caracterización de mutantes insercionales en genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos de *DFG10* de *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
76. Sakaiharu, T., Honda, A., Tateyama, S. & Sagami, H. 2000. Subcellular fractionation of polyprenyl diphosphate synthase activities responsible for the syntheses of polyprenols and dolichols in spinach leaves. *Journal of Biochemistry*. 128: 1073 – 1078.
77. Sato, M., Sato, K., Nishikawa, S., Hirata, A., Kato, J. & Nakano, A. 1999. The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolicol synthesis. *Molecular and Cellular Biology*. 19, 1: 471 – 483.
78. Scheuring, D., Viotti, C., Falco, Kruger F., Kunzl, F., Sturm, S., Bubeck, J., Hillmer, S., Frigerio, L., Robinson, D., Pimpl, P. & Schumacher, K. 2011. Multivesicular Bodies Mature from the Trans-Golgi Network/Early Endosome in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 23: 3463–3481.
79. Schwarz, F. & Aebi, M. 2011. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*. 21: 576 – 582.
80. Skorupinska-Tudek, K., Poznanski, J., Wojcik, J., Bienkowski, T., Szostkiewicz, I., Zelman-Femiak, M., Bajda, A., Chojnacki, T., Olszowska, O., Grunler, J., Meyer, O., Rohmer, M., Danikiewicz, W. & Swiezewska, E. 2008. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of dolichols in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 283, 30: 21024 – 21035.
81. Spitzer, C., Reyes, F., Buono, R., Sliwinski, M. & Haas, T. Otegui M. 2009. The ESCRT-Related CHMP1A and B Proteins Mediate Multivesicular Body Sorting of Auxin Carriers in *Arabidopsis* and Are Required for Plant Development. *The Plant Cell*. 21: 749 – 766.
82. Surmacz, L. & Swiezewska, E. 2011. Polyisoprenoids – Secondary metabolites or physiologically important superlipids? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 407: 627 – 632.
83. Surpin, M. & Raikhel, N. 2004. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature reviews molecular cell biology*. 5: 100 – 109.
84. Swiezewska, E. & Danikiewicz, W. 2005. Polyisoprenoids: Structure, biosynthesis and function. *Progress in Lipid Research*. 44: 235 – 258.
85. Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, 3ra ed., Sinauer Associates. Sunderland, MA Cap 1.
86. Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., von Wirén, N. & Fujiwara, T. 2005. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *PNAS*. 102. 34: 12276 – 12281.

87. Tanz, S., Castleden, I., Hooper, C., Vacher, M., Small, I. & Millar, A. 2013. SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*. 41: D1185 – D1191.
88. Tian, G., Mohanty, A., Chary, S., Li, S., Paap, B., Drakakaki, G., Kopec, C., Li, J., Ehrhardt, D., Jackson, D., Rhee, S., Raikhel, N. & Citovsky, V. 2004. High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta. *Plant Physiology*. 135. 1 – 14.
89. Tóth, R. & van der Hoorn, R. 2009. Emerging principles in plant chemical genetics. *Trends in Plant Science*. 12, 2: 81 – 88.
90. Vida, T. & Emr S. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *Journal of Cell Biology*. 128: 779 – 792.
91. Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., Jürgens, G., de Vries, S., Robinson, D. & Schumacher, K. 2010. Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-Golgi network/Early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *The plant cell*. 22: 1344 – 1357.
92. Wang, D., Weaver, N., Kesarwani, M. & Dong, X. 2005. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*. 308: 1036 – 1040.
93. Werner, T., Motyka, L., Laucou, V., Smets, R., van Onckelen, H. & Schmittling, T. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indication opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*. 15: 2532 – 2550.
94. Winther, J., Stevens, T. & Kielland – Brandt, M. 1991. Yeast carboxypeptidase Y requires glycosylation for efficient intracellular transport, but not for vacuolar sorting, in vivo stability, or activity.
95. Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C. & Korber, B. 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*. 14, 12: 1229 – 1246.
96. Zhang, H., Ohyama, K., Boudet, J., Chen, Z., Yang, J., Zhang, M., Muranaka, T., Maurel, C., Zhu, J. & Gong, Z. 2008. Dolichol biosynthesis and its effects on the unfolded protein response and abiotic stress resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 20: 1879 – 1898.
97. Zhang, M., Henquet, M., Chen, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Ren, X., van der Krol, S., Gonneau, M., Bosch, D. & Gong, Z. 2009. *LEW3*, encoding a putative  $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase (ALG11) in N-linked glycoprotein, plays vital roles in cell-wall biosynthesis and the abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 60: 983 – 999.
98. Zouhar, J., Hicks, G. & Raikhel, N. 2004. Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *PNAS*. 101, 25: 9497 – 9501.