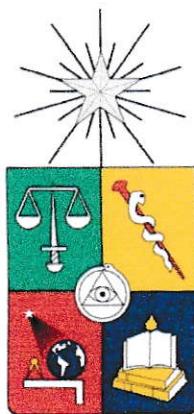


JCH-FC
MAG-BMCN
= 866
-1



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE
GENES CANDIDATOS A PARTICIPAR EN
TRANSPORTE IÓNICO DE
ARABIDOPSIS THALIANA PARA
AUMENTAR LA TOLERANCIA A ESTRÉS
IÓNICO EN *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De
Magister en Ciencias con Mención en Biología Molecular,
Celular Y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

**Matías Andrés Freire Díaz
Marzo, 2013**

Director de Tesis Dr: Lorena Norambuena Morales



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

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

MATÍAS ANDRÉS FREIRE DÍAZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14 de Noviembre de 2012.

Director de Tesis:

Dra. Lorena Norambuena Morales

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Michael Handford

Dr. Liliana Cardemil

Esta tesis es el resultado de mucho esfuerzo, sacrificios y alegrías la cual dedico a mi familia y mujer que amo María Gabriela Miño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi familia compuesta por mis padres, hermanos y polola por apoyarme durante el desarrollo de la investigación, la cual tiene de dulce y agraz, donde la familia siempre es parte vital para lograr el mejor resultado. Especialmente reconozco el gran apoyo, ayuda y tolerancia de mi polola, la mujer que amo, sin ella seguramente este trabajo no habría sido igual, gracias por la gran ayuda entregada.

También fueron muy importantes mis amigos, con los cuales compartí durante muchas oportunidades mis ideas, hipótesis y resultados, entregándome una valiosa opinión además de su apoyo y amistad. Muchas gracias Daniela Muñoz, Oriana Flores, Jorge Vera B. y Daniel Espinoza C.

Durante esta investigación fueron muy significativos mis pares con los cuales compartí día a día en el laboratorio, aportando con interesantes ideas y discusiones que permitieron enriquecer este trabajo. En especial reconozco la ayuda prestada por el Dr. Alexander Vergara, la Dra. (c) Lorena Pizarro y la Dra. Daniela Urbina, los cuales estuvieron siempre dispuestos a compartir su invaluable experiencia y conocimiento. Junto con ellos, me gustaría comentar al gran grupo humano y científico del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, donde destaca el gran respaldo, confianza, preocupación y dedicación de mi tutora, la Dra. Lorena Norambuena Morales.

Agradezco a los proyectos INNOVA Corfo 08CM01-12 y al proyecto FONDECYT 11080240 por el financiamiento entregado para desarrollar la investigación presentada en esta Tesis de Magister.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Homeostásis iónica.....	1
1.2 Estrés abiótico.....	2
1.3 Plantas y sus adaptaciones	3
1.4 Búsqueda de nuevos genes relacionados con el metabolismo iónico	6
1.5.- Modelo de estudio: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos específicos.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 Análisis bioinformático y análisis bibliográfico.....	15
2.1.1 Análisis de perfiles de expresión de plantas sometidas a estrés salino y estrés osmótico.	16

2.2 Obtención de los fragmentos génicos correspondientes a los ITRG1, 2 y 3 de <i>A. thaliana</i> para ser clonadas en vectores para posteriores análisis moleculares.....	18
2.2.1 Material Biológico.....	18
2.2.1.1 Tejido Vegetal.....	18
2.2.1.2 Cepas Bacterianas.....	19
2.2.1.3 Levaduras.....	19
2.2.2 Diseño y ejecución de construcciones moleculares y la posterior evaluación en levaduras.	19
2.2.2.1 Extracción, verificación y cuantificación de RNA.....	19
2.2.2.2 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	21
2.2.2.3 Diseño de partidores.	22
2.2.2.4 Amplificación de los fragmentos para la clonación.....	23
2.2.2.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	24
2.2.2.6.1 Clonación.....	25
2.2.2.6.2 Transformación de células competentes.....	26
2.2.2.7 Identificación de bacterias transformantes.....	27
2.2.2.8 Recombinación.....	29
2.2.2.9 Transformación de levaduras.....	32
2.2.2.9.1 Preparación de levaduras competentes.....	32

2.2.2.9.2 Incorporación de las distintas construcciones en levaduras.....	32
2.2.2.10 Ensayos de tolerancia a cationes metálicos en <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2.2.11 Análisis de la expresión de proteínas fusionadas a EGFP.....	36
2.2.2.12 Expresión de proteínas mediante Western blot	37
2.2.2.12.1 Extracción de proteínas.	37
2.2.2.12.2 Precipitación de proteínas.....	38
2.2.2.12.3 Cuantificación de proteínas.....	38
2.2.2.12.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS- PAGE).....	39
2.2.2.12.5 Tinción de geles de poliacrilamida con Azul de coomassie.....	39
2.2.2.12.6 Western blot.....	40
2.3 Tratamientos estadísticos de los datos.	43
RESULTADOS.....	44
3.1 Selección y caracterización de genes de <i>A.thaliana</i> relacionados a transporte iónico.....	44
3.1.1 Obtención de los genes con mayor probabilidad para estar involucrados en el metabolismo iónico.....	44
3.1.2 Análisis de topología de la red de co-expresión génica de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.1.3 Características de ITRG1, ITRG2 y ITRG3.....	49

3.1.4 Análisis de los perfiles de expresión de plantas sometidas a estrés salino y estrés osmótico.....	54
3.2 Generación de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con los genes de <i>A. thaliana</i> con alta probabilidad de estar implicados en el transporte iónico (ITRG).....	58
.2.1 Obtención de las secuencias de <i>A. thaliana</i> correspondientes a los ITRG 1, 2 y 3 y clonamiento en vectores para posteriores análisis funcionales.....	59
3.2.1.1 Extracción y procesamiento de RNA de plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> ...	59
3.2.1.2 Amplificación de los ITRG de <i>A. thaliana</i>	59
3.2.2 Clonación de los marcos de lectura abierto de ITRG 1, 2 y 3 en el vector pCR8.....	60
3.2.2.1 Ligación y clonación de los ITRG en el vector pCR8.....	61
3.2.2.2 Secuenciación de las construcciones pCR8-ITRG3, pCR8-ITRG3 y pCR8-ITRG3.....	63
3.2.2.3 Obtención de los vectores de expresión en levaduras con los genes ITRG 1, 2 y 3.	64
3.2.3 Transformación de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY 4743 con las construcciones realizadas con los ITRG 1, 2 y 3.....	66
3.2.3.1 Confirmación de las levaduras transformadas con las construcciones realizadas con los ITRG en los vectores pYES-DEST52, pAG426GPD-ccdB-HA y pAG426GPD-ccdB-GFP.	66
3.2.3.2 Análisis de la acumulación de proteínas ITRG en levaduras mediante Western blot.....	66
3.2.3.3 Análisis de la acumulación de proteínas de fusión ITRG1, 2 y 3 con GFP en levaduras transformadas con las construcciones pAG426GPD-ITRG-GFP.....	69
3.3 Evaluación de la tolerancia a condiciones salinas estresantes en <i>S. cerevisiae</i> transformada con las construcciones que poseen ITRG 1, ITRG 2 y ITRG 3.....	71

3.3.1 Evaluación de la tolerancia a cationes metálicos presentadas por <i>S. cerevisiae</i> que expresan los ITRG 1, 2 y 3 bajo el control del promotor inducible por galactosa.....	72
3.3.2 Evaluación de la tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> transformadas construcciones de promotor con expresión constitutiva.....	81
3.3.2.1 Evaluación de la tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con las construcciones realizadas con el vector pAG426GPD-ccdB-HA.....	81
3.3.2.2 Evaluación de la tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con construcciones realizadas con el vector pAG426GPD-ccdB-GFP.....	87
DISCUSIÓN.....	96
4.1 Selección y caracterización de genes de <i>A.thaliana</i> relacionados a la función de transporte iónico.....	96
4.2. Obtención de las secuencias de interés para ser posteriormente transformadas en levaduras y expresar las proteínas codificadas por los marcos de lectura abiertos ITRG1, 2 y 3.	102
4.3. Evaluación de la tolerancia de levaduras <i>S. cerevisiae</i> transformadas con las construcciones realizadas que poseen los ORF de ITRG1, ITRG2 y ITRG3.....	105
CONCLUSIONES.....	112
REFERENCIAS.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Herramientas bioinformáticas empleadas para realizar predicciones de localización subcelular.....	16
Tabla 2: Medio hidropónico de cultivo de plantas (100X):.....	18
Tabla 3: Programa para realizar la transcripción reversa.....	21
Tabla 4: Partidores.....	22
Tabla 5: Aminoácidos que contiene el medio mínimo YMM	34
Tabla 6: Cationes metálicos utilizados para los ensayos de tolerancia de <i>S.cerevisiae</i>	36
Tabla 7: Genes identificados en la red de co-expresión génica como nuevos genes involucrados en transporte iónico (Ion Transport GO term:0006811).....	44
Tabla 8: Información disponible de los ITRG según TAIR.....	46
Tabla 9: Descripción de las categorías de Gene Ontology.....	48
Tabla 10: Predicciones bioinformáticas de la localización subcelular y posibles dominios transmembrana de ITRG1.....	51
Tabla 11: Predicciones bioinformáticas de la localización subcelular y posibles dominios transmembrana de ITRG2.....	52
Tabla 12: Predicciones bioinformáticas de la localización subcelular y posibles dominios transmembrana de ITRG3.....	53
Tabla 13: Endonucleasas utilizadas para verificar las construcciones con los vectores de expresión en levaduras.....	65
Tabla 14: Masas molares esperados de las proteínas codificadas en las distintas construcciones.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anotación del genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
Figura 2: Análisis de coexpresión de vecindario.....	11
Figura 3: Vector de entrada pCR8/GW/TOPO.....	25
Figura 4: Vectores GATEWAY de expresión en levadura previa y post recombinación homóloga.....	30
Figura 5: Vectores de expresión de proteínas de fusión en plantas.....	31
Figura 6: Protocolo de inducción de las construcciones que poseen el promotor GAL1 transformadas en levaduras.....	35
Figura 7: Histograma que muestra la representación de etiquetas moleculares, ligadas al metabolismo iónico en los vecinos génicos directos a los ITRG, en la red de co-expresión utilizada para todos los genes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
Figura 8: Normalización de los datos de microarreglos realizados a plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en situación control, estrés osmótico y estrés salino.....	55
Figura 9: Perfiles de expresión de los ITRG correspondientes a datos de microarreglos de estrés salino y osmótico.....	57
Figura 10: Perfiles de expresión de los ITRG seleccionados en este estudio.....	57
Figura 11: Electroforesis de RNA en condiciones denaturantes.....	59
Figura 12: Electroforesis de los fragmentos amplificados, correspondientes a los marco de lectura abierto de ITRG 1, 2 y 3.	60
Figura 13: Electroforesis de los fragmentos de DNA productos de las digestiones enzimáticas realizadas a las construcciones efectuadas con pCR8 y los ITRG1, 2 y 3.....	67
Figura 14: Detección de las proteínas ITRG1, ITRG2 e ITRG3 en extractos proteicos de levaduras transformadas con las construcciones correspondientes...	68
Figura 15: Las proteínas de fusión ITRG 1, ITRG 2 e ITRG 3 con GFP se acumulan en las levaduras transformantes.....	70

Figura 16: Tolerancia de levaduras transformadas con la construcción pYES-ITRG1.....	74
Figura 17: Tolerancia de levaduras transformadas con pYES- ITRG 2.....	77
Figura 18: Tolerancia de levaduras transformadas con pYES- ITRG 3.....	80
Figura 19: Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 1- HA.....	84
Figura 20: Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 3- HA.....	86
Figura 21: Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 1- GFP.....	88
Figura 22: Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 2- GFP.....	90
Figura 23: Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 3- GFP.....	93

ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

CDS: Secuencia codificante

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: deoxinucleótidos

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGFP: *Enhanced Green fluorescent protein* o proteína verde aumentada

GO: *Gene Ontology*

ITRG: *Ion Transport Related Genes* o genes relacionados con el transporte iónico

HA: Hematoglunina

HIS: Histidina

MOPS: 3-morfolino-1-propanosulfonato

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NASC:

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

RMA: Robust Method Analysis o método de análisis robusto

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, con transcripción reversa

SOD: Superóxido dismutasa

TBS-T: Tris buffer salino-Tween

TE: TRIS-EDTA

TEMED: Tetramethylethylenediamine

YMM: yeast minimal médium

YPD: yeast peptone dextrose

RESUMEN

La homeostasis iónica es de gran importancia para mantener la integridad celular. Esta comprende el transporte y regulación de concentraciones relativas de iones esenciales. Las plantas son organismos sésiles, por lo que poseen gran capacidad para adaptarse a los cambios ambientales y tolerar distintas agresiones. A través de sus raíces están en permanente contacto con distintos metales en el suelo, las plantas resultan una fuente interesante en la búsqueda de nuevos genes involucrados en transporte iónico. La alternativa más atractiva en este ámbito es *Arabidopsis thaliana*, debido a que se han desarrollado múltiples herramientas para analizar los datos disponible de esta planta. Entre las disciplina con mayor desarrollo está la genómica y el análisis de microarreglos.

Se realizó una búsqueda y selección de genes mediante coexpresión que se basa en el análisis de la expresión de los distintos genes de *Arabidopsis* frente a diferentes estímulos o condiciones utilizando los datos públicos de microarreglos disponibles de esta planta. Esta estrategia permite aumentar el conocimiento existente sobre genes implicados en la homeostasis iónica y la resistencia frente a estrés salino producido por metales. Se obtuvo una lista de doce genes con alta probabilidad de estar involucrados en transporte iónico, de los cuales se seleccionaron tres, estos poseen como una anotación en el GO correspondiente a fotorrespiración, lo cual podría estar relacionado con el transporte iónico.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los genes candidatos de *Arabidopsis thaliana* para estar involucrados en transporte iónico, estos se clonaron y transformaron en *Saccharomyces Cerevisiae*, donde se evaluó su capacidad para modificar la tolerancia a estrés salino. Se realizaron tres tipos de construcciones para evaluar la expresión de los genes en diferentes contextos genéticos, incluyendo diferentes promotores y etiquetas moleculares. Las levaduras transformantes fueron co-incubadas con diferentes concentraciones de NaCl, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CuSO_4$ y $CoSO_4$, midiéndose el crecimiento en el tiempo como parámetro para expresar la tolerancia o sensibilidad. Se observó que levaduras transformadas con los constructos que poseen los ITRGs comandados por un promotor inducible muestran mayor tolerancia frente a gran parte de los metales evaluados, detectando diferencias de hasta cuatro y cinco veces con respecto al crecimiento de las levaduras controles. Las levaduras transformadas con construcciones de promotor de expresión permanente, muestran en su mayoría sensibilidad frente a los metales evaluados, en comparación con las levaduras controles. Sin embargo, en algunos casos, se observa una tolerancia frente a las concentraciones menores de los distintos metales.

Se demostró que los tres ITRGs evaluados estarían implicados en funciones relacionadas con el transporte iónico, debido que son capaces se modificar la tolerancia/sensibilidad otorgada a las levaduras transformadas.

ABSTRACT

Ion homeostasis is very importance in maintaining cell integrity. This includes the transport and regulation of relative concentrations of essential ions. Plants are sessile organisms and therefore have great capacity to adapt to environmental changes and tolerate different attacks. Through its roots are in permanent contact with different metals in the soil, plants are an interesting source in the search for new genes involved in ion transport. The most attractive alternative in this area is *Arabidopsis thaliana*, because many tools have been developed to analyze the data available from this plant. Among the more developed discipline is genomics and microarray analysis.

A genes search and co-expression selection was made, based on the expression analysis of *Arabidopsis*'s genome against different stimuli or conditions using microarray public data available from this plant. This strategy allows increasing existing knowledge about genes involved in ion homeostasis and resistance to salt stress caused by metals. We obtained a list of twelve genes with a high probability of being involved in ion transport, of which three were selected, they have as photorespiration GO annotation, which could be related to ion transport.

In order to evaluate the *Arabidopsis thaliana*'s candidate genes ability to be involved in ion transport, these were cloned and transformed into *Saccharomyces cerevisiae*, which assessed their ability to change the tolerance to salt stress. Were performed three types of constructions to evaluate the expression of genes in different genetic backgrounds including different promoters and molecular tags. Yeast transformants were co-incubated with different concentrations of NaCl, ZnCl₂, CdCl₂, CuSO₄ and CoSO₄, measuring growth over time as a parameter to express the tolerance or sensitivity. It was observed that yeast transformed with the constructs that have the ITRGs commanded by an inducible promoter show greater tolerance to many of the metals tested, detecting differences of up to four to five times compared to controls yeast growth. Yeast transformed with constructs permanent expression promoter, show most sensitivity to the metals tested, compared with controls yeasts. However, in some cases, there is a tolerance for lower concentrations of different metals.

It was shown that the three evaluated ITRGs would be involved in functions related to ion transport, because they are able to modify the conferred tolerance / sensitivity to yeast transformed.

INTRODUCCIÓN

1.1 Homeostasis iónica

Para todos los organismos vivos la homeostasis iónica es de gran importancia para mantener la integridad celular. Esta comprende el transporte y regulación de concentraciones relativas de iones esenciales, tales como Sodio (Na^+), Magnesio (Mg^{2+}), Potasio (K^+), Calcio (Ca^{2+}) o Hierro ($\text{Fe}^{2+/3+}$) (Mahajan y col. 2008; Sun y col. 2009; Dodd y col. 2010; Kobayashi y col. 2010; Jomova y Valko 2011). Es importante la conservación de las concentraciones de estos iones, ya que si bien son elementos vitales, en elevadas cantidades pueden ser altamente tóxicos (Jomova y Valko 2011). Algunos de estos elementos poseen roles esenciales en muchos procesos celulares. Por ejemplo calcio participa como segundo mensajero y es activador de múltiples procesos metabólicos en células eucariontes (Dodd y col. 2010). Otro ejemplo, son los iones, tales como el hierro y el cobre, participantes en la defensa frente a especies reactivas de oxígeno, formando parte los grupos prostéticos de las proteínas que catalizan las reacciones redox (Kourie 1998; De Freitas et al. 2003). También están involucrados en sitios activos coordinantes de moléculas biológicas de gran importancia, como es el caso de Fe^{+2} en la hemoglobina (Zimblet et al., 2009; Jomova and Valko, 2011) o el Mg^{+2} en la clorofila (Masuda, 2008). Es decir, siendo fundamentales para procesos como la captación de O_2 en la respiración pulmonar de mamíferos o la captación lumínica en plantas, respectivamente. Además de participar como cofactor en variados procesos

enzimáticos, sitios activos, etc. En general, la característica química más importante de los metales participantes en los múltiples procesos descritos, es que son metales de transición, por lo que poseen la habilidad de donar y aceptar fácilmente electrones (De Freitas et al., 2003). Por otro lado, iones metálicos no vitales son aquellos que están en relación con los organismos, existe una maquinaria molecular implicada en su homeostasis (o tolerancia), sin embargo no son imprescindibles para el desarrollo y crecimiento de estos organismos, dentro de este grupo están el Litio (Li), Arsénico (As), Plata (Ag), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Mercurio (Hg) y Plomo (Pb) que están presentes en el medio ambiente son movilizados, almacenados, modificados o removidos en algunos organismos mediante mecanismos de tolerancia y detoxificación (Silver y Phung, 2005).

1.2 Estrés abiótico

Se estima que el estrés abiótico es la mayor causa de pérdida de cultivos a nivel mundial, reduciendo los rendimientos para la mayoría de las plantas de cultivo en más del 50% (Z. Wang y B. Huang 1982; Zhu 2001; W. Wang y col. 2003; Tuteja 2010). Para las plantas, se considera estrés abiótico, la escasez de agua, la alta salinidad, los metales pesados, las temperaturas extremas, la anaerobiosis, agentes químicos tóxicos o en concentraciones nocivas. Todos estos estreses poseen un efecto primario particular y además como efecto secundario, desencadenan estrés oxidativo (Sun y col., 2009). Cerca del 20% de las tierras cultivadas en el mundo y casi la mitad de las tierras de regadío son afectadas por alta salinidad, causando en ellas un desequilibrio iónico y un estrés hiper-osmótico (Zhu 2001; Abogadallah y col. 2011; Huang y col. 2011).

Dentro de los principales efectos de los metales en plantas se encuentra: la reducción de la biomasa, clorosis en las hojas, inhibición del crecimiento radicular,

además de alteraciones morfológicas. Dependiendo de la dosis y biodisponibilidad los metales pueden incluso causar muerte en las plantas. Altas concentraciones de metales como el cadmio son fuertes inhibidores enzimáticos, degeneran las mitocondrias, producen aberraciones en mitosis desencadenando una inhibición de la proliferación celular y la división en los meristemas. También causa daños en el aparato fotosintético, induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tejidos fotosintéticamente activos, etc (Lin y Aarts, 2012).

Cobalto por otro lado, inhibe la formación de clorofila b, produce cambios morfológicos en plastidios, entre otros (Palit y Sharma, 1994).

1.3 Plantas y sus adaptaciones

Es ampliamente reconocida la capacidad de las plantas para soportar y adaptarse a condiciones adversas de altas temperaturas, baja cantidad de agua, altas concentraciones de sales, etc (Kasuga y col. 1999; Kawasaki y col. 2001; Munns 2002). Las plantas son organismos sésiles, por lo tanto deben desarrollar adaptaciones morfológicas, fisiológicas y moleculares para soportar las condiciones estresantes que les impone el medio en que viven. Cuando estas condiciones sobrepasan el límite de adaptación del organismo se desencadena el estrés. Debido a esta ventaja de las plantas, con el objetivo de mejorar el conocimiento global que se tiene del fenómeno y también la posible utilidad de los mecanismos moleculares en diversos procesos productivos, resulta interesante buscar y seleccionar genes de plantas implicados en el metabolismo iónico.

El consorcio *The Gene Ontology Consortium*, tiene como propósito unificar bajo un mismo lenguaje de términos jerárquicos, todas las características conocidas de los genes eucarióticos. Los datos se almacenan en la base de datos *Gene Ontology* (GO, The Gene Ontology Consortium, 2000) mediante tres categorías, "*Función Molecular*", "*Proceso Biológico*" y "*Componente celular*". La "*Función Molecular*" se define como la actividad bioquímica que realiza el producto génico codificado por dicho gen (Ej: enzima, transportador, ligando). "*Proceso Biológico*" se refiere a la función biológica en el cual el producto génico contribuye (Ej: transducción de señales, traducción, transcripción, fotosíntesis, fotorrespiración). En tanto, "*Componente Celular*" hace referencia a lugar de la célula donde el producto génico es activo (Ej: mitocondria, cloroplasto, citoplasma).

En *Arabidopsis thaliana*, del total de genes secuenciados, sólo se conoce la función molecular del 57% de ellos. Quedando el 38% de los genes sin función molecular asignada que corresponde a más de 10.000 genes. Situación similar ocurre con los procesos biológicos y componentes celulares, de todos los genes de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org, Noviembre 2010), tal como se aprecia en la Figura 1. Esto significa que el universo de genes con función desconocida es enorme y por lo tanto la potencialidad de encontrar nuevos genes relacionados al proceso de metabolismo de iones es alta.

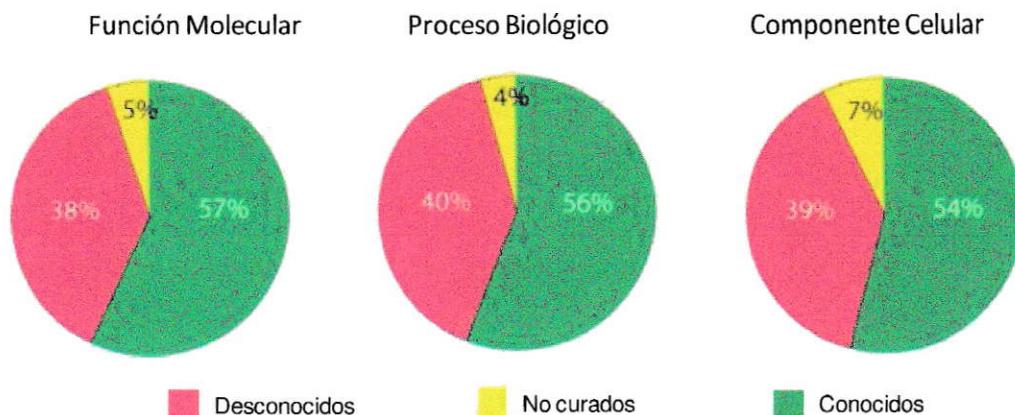


Figura 1: Anotación del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Los gráficos de torta indican la porción del genoma de *Arabidopsis thaliana* que corresponde a genes de función conocida (anotados), desconocida (no anotados) y no curados para los 3 términos GO (Función Molecular, Proceso Biológico y Componente Celular) con los cuales se describen jerárquicamente los genes según *The Gene Ontology Consortium* (GO, The Gene Ontology Consortium, 2000). Figura modificada de *Genome snapshot* (www.arabidopsis.org), actualizados a Noviembre de 2010.

Un modelo interesante a estudiar en el metabolismo iónico, son las plantas halófitas Manglares (*Avicennia officinalis*, *Bruguieracy lindrica*, *Ceriopsde candra*, *Rhizophora apiculata*, etc), plantas que naturalmente se sitúan en zonas costeras con directo contacto de agua marina. Se ha demostrado que estas plantas poseen concentraciones similares a las indicadas como tóxicas para distintos organismos (Agoramoorthy y col. 2008). Estas plantas pueden bioacumular cationes metálicos tales como Zn^{+2} , Cu^{+2} y Cd^{+2} . Sin embargo, el conocimiento de su genoma es mínimo y se hace dificultosa la posibilidad de trabajar con estas especies, debido a las condiciones en las que naturalmente crecen y se desarrollan. En las plantas halófitas, mayoritariamente se han estudiado enzimas que le confieren resistencia contra el estrés oxidativo como la cobre/zinc SOD (Jithesh et al., 2006; Prashanth et al., 2008). Al contrario, *Arabidopsis thaliana* (típica planta glicófita), posee su genoma secuenciado y existe amplia información disponible de este. A pesar de que no presenta una tolerancia extraordinaria al estrés salino, varias evidencias indirectas, relacionadas con genes de plantas de tomate silvestres que estimulan el

crecimiento en tomates de cultivares de mayor tamaño sugieren que esta planta tendría muchos, si es que no todos los genes de tolerancia que se pueden encontrar en las plantas halófitas (Zhu 2000).

1.4 Búsqueda de nuevos genes relacionados con el metabolismo iónico

El encontrar genes relacionados con el metabolismo iónico tiene varios objetivos. El que parece más importante es generar cultivos vegetales más resistentes a las condiciones estresantes de metales, y de esta forma lograr mayor productividad y mayor biomasa vegetal (Vinocur y Altman 2005; Phang y col. 2008). Sin embargo paralelo a esto, se plantea la idea de generar organismos que sean capaces de resistir altas concentraciones de sales y metales, y además capaces de removerlos, con la finalidad de biorremediar lugares contaminados (Ivanova et al., 2011). Generalmente estos daños se producen en lugares cercanos a minas de extracciones de metales, o cercanos a industrias que desechan sustancias sin el tratamiento adecuado. Además está la posibilidad de generar nuevos organismos que en vez de ser más tolerantes, sean más sensibles al estrés salino. De esta forma poder ser empleados como biosensores (de Champdoréy col. 2007; Barriuso y col. 2008; Lingrui Zhang y Xing 2008). Es de interés mundial el desarrollo de mecanismos que permitan obtener organismos tolerantes a estrés salino. En esta línea, existen investigaciones donde se ha tenido éxito con plantas, levaduras y bacterias. Por ejemplo, en el 2007 se reportó la sobreexpresión de la enzima málica dependiente de NADP (EC 1.1.1.40) de *Oryza sativa*, la cual le confiere tolerancia al estrés salino y osmótico a *Arabidopsis thaliana* (Liu y col. 2007). En India, recientemente aumentó la tolerancia al estrés salino transformando plantas de *Nicotiana tabacum* con un gen que codifica para una helicasa de arveja (*Pisum sativa*) (Tuteja, 2010). En los últimos tiempos, estudios de metagenómica también

han tenido como objetivo el descubrimiento de genes implicados en la homeostasis iónica. La investigación de Kapardar y col, en el 2010, realizándose genotécas desde muestras colectadas desde agua estancada, encontró dos genes (*putative general stress protein (GspM)* y *putative enoyl-CoA hydratase (EchM)*), los cuales son capaces de aumentar varias veces la tolerancia a NaCl de cepas transformantes de *Escherichiacoli* (Kapardar y col. 2010). En el 2010, el grupo de Yang y col. publicó un estudio realizado con el gen que codifica para una proteína parecida a metalotioneína (*metallothionein-like*), de *Thamarix hispida*. Este gen fue transformado en *Saccharomyces cerevisiae*, confiriéndole resistencia a distintos metales, tales como Na⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ (J. Yang y col. 2010).

Desde el año 2000, con el genoma de *Arabidopsis thaliana* secuenciado nacieron múltiples líneas de investigación que tienen como finalidad el análisis e interpretación de esta gran cantidad de información. Se han creado bases de datos y herramientas que permiten su estudio, tales como “*The Arabidopsis Information Resource*” (TAIR) (Rhee y cols., 2003; Swarbreck y cols., 2008), donde están a libre disposición para la comunidad científica, todos los datos recabados de los genes de Arabidopsis. Se pueden encontrar las secuencias, sus respectivas secuencias CDS, mRNA, secuencias proteicas, las anotaciones (GO) de cada gen obtenidas hasta la fecha, la disponibilidad de mutantes, etc. Además, para *Arabidopsis thaliana* existen bases de datos de expresión génica públicas como el “*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*” (NASC) (Craigon et al., 2004), donde se pueden obtener y analizar muchos experimentos de microarreglos realizados por distintos grupos de investigación, tales como análisis de expresión de todos los genes de Arabidopsis sometidas a estrés térmico, hídrico, salino, osmótico, etc.

El análisis global de datos de microarreglos de DNA y de datos de co-expresión, ha sido ampliamente utilizado en los últimos años como una forma para proponer una función a los genes de función desconocida y de plantear hipótesis que puedan ser validadas experimentalmente (Mochiday col. 2011). Los análisis de expresión a gran escala en distintos organismos modelo, han mostrado que los genes que participan en un mismo proceso biológico tienden a presentar patrones de expresión muy similares frente a un determinado estímulo o condición de crecimiento (Williams y Bowles 2004a). En múltiples investigaciones, realizadas en varios tipos de organismos, se ha encontrado que genes implicados en el mismo proceso celular, se expresan conjuntamente en humanos, *Drosophila*, levaduras, *Caenorhabditis elegans* en *Arabidopsis thaliana* (Cohen y col. 2000; Lercher y col. 2002; Spellman y Rubin 2002; Lercher y col. 2003; Williams y Bowles 2004b; Ren y col. 2005; Aoki y col. 2007), este hecho es la base de la co-expresión. Con este tipo de análisis y su validación experimental posterior, es posible anotar funcionalmente a los genes codificantes para proteínas. Una de las grandes fortalezas de esta metodología frente a las tradicionales, como son emplear genes que previamente se hayan asociado y descrito como implicados en el transporte iónico, es que permite otorgarle a un gen sin anotación previa, o encontrar nuevas anotaciones, respecto a las funciones moleculares o los procesos biológicos, en que su producto proteico está involucrado, independientemente de la información que entrega su secuencia (Quackenbush 2003; Berardini y col. 2004; Obayashi et al. 2007; Obayashi et al. 2008).

Se utilizaron los resultados entregados por una red de co-expresión génica de *Arabidopsis thaliana*, disponible en el laboratorio. Esta red fue realizada por el Dr Alexander Vergara en nuestro laboratorio utilizando datos de 1.701 microarreglos

de alta calidad ATH1 Affymetrix™ 22K, correspondientes a datos recopilados de distintos tratamientos realizados a plantas de Arabidopsis. La red resultante posee 5.293 nodos correspondientes a los genes y 18.853 segmentos de unión que correspondían a los genes que tienen un coeficiente de correlación de Spearman ≥ 0.8 , es decir la red posee todos aquellos genes correlacionados a un nivel de 0.8. En la figura 2 se muestra un esquema representativo de la red realizada. La red construida se sometió a un análisis de enriquecimiento hipergeométrico. Luego de esto, se realizó un análisis de vecindario, empleando la representación de la etiqueta molecular Ion Transport (GO: 0006811) con p-values ≤ 0.05 y se buscó genes “nuevos” en nuestra red con esta etiqueta molecular. Con distintos niveles de corte (CUT-OFF) correspondientes al coeficiente de correlación de Spearman se pueden tener grupos de genes que posiblemente estén involucrados en el transporte de iones. Con un CUT-OFF ≥ 0.6 se obtienen 55 genes, con un CUT-OFF ≥ 0.7 , la red propone 23 genes. Mientras que con un CUT-OFF ≥ 0.8 , se tienen 12 genes que tienen la alta probabilidad de estar implicados en el transporte de iones, según la red construida. Estos 12 genes tienen igual posibilidad de estar implicados en esta función molecular, por lo tanto, es el punto de partida de una línea de investigación que los estudie.

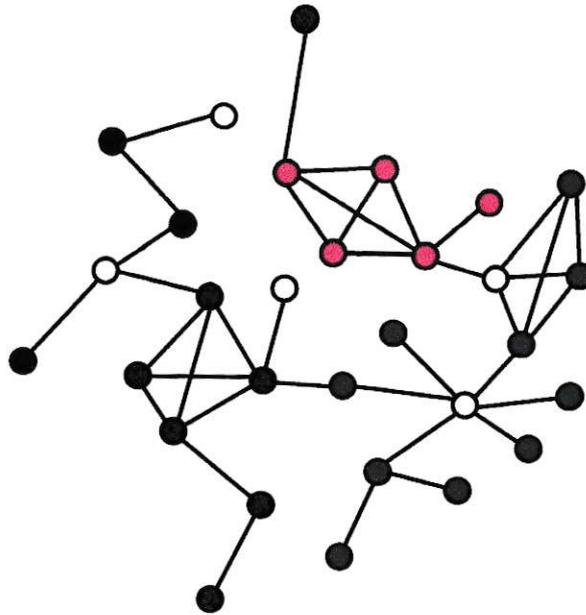


Figura 2: Análisis de coexpresión de vecindario. Esquema ilustrativo del principio empleado para el análisis de vecindario en la red de coexpresión. Cada círculo corresponde a un nodo y las uniones entre ellos indican que genes en los correspondientes nodos se coexpresan. Por ejemplo, los círculos azules representan aquellos nodos que poseen la etiqueta molecular *Ion Transport* (GO:0006811), estos estarían propagando la anotación al círculo blanco, conectado por varios azules, en la parte inferior derecha del esquema.

En base al análisis de co-expresión realizado en *Arabidopsis thaliana* en el laboratorio contamos una lista de 12 genes que tienen una alta probabilidad de estar involucrados en homeostasis iónica. Sin embargo, la co-expresión no indica necesariamente una relación funcional directa entre grupos de genes, pero sí da indicios de que los genes pueden estar implicados en un mismo proceso (Lercher y col. 2003; Persson y col. 2005; Coulibaly y Page 2008; Horan y col. 2008)

1.5.- Modelo de estudio: *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae son microorganismos ampliamente utilizados (Arsenault y col. 2008; Tehseen y col. 2010). Esto se debe a que tienen un genoma haploide de 16 cromosomas, poseen una rápida reproducción, permitiendo una fácil manipulación génica y la existencia de herramientas moleculares disponibles que posibilitan un manejo experimental eficiente.

Las levaduras, a diferencia de las bacterias, poseen la ventaja de ser organismos eucariontes por lo que muchos de los mecanismos celulares y moleculares son conservados con plantas.

Queremos determinar qué ocurriría en levaduras respecto a la tolerancia frente a metales, al expresar genes de *A. thaliana* que se han predicho, están relacionados con transporte iónico. Lo que nos interesa, es obtener un cambio en el fenotipo de las levaduras silvestres, generalmente estos cambios de fenotipo están asociados a la expresión de proteínas y estas pueden tener modificaciones post-traduccionales, *Saccharomyces cerevisiae* nos resulta mucho más conveniente para este objetivo (Arsenault y col. 2008; Rea y col. 2010). Además de ser un muy buen modelo, representa una oportunidad muy conveniente, debido a que esta levadura se emplea en múltiples procesos productivos. Por lo tanto el lograr obtener una levadura con características particulares, con un metabolismo iónico modificado, ofrece prometedoras posibilidades de conocimiento y descripción de nuevos genes asociados al transporte iónico y futuras aplicaciones en diversas áreas.

Debido a lo expuesto anteriormente, una buena alternativa para encontrar genes candidatos para otorgar tolerancia frente al estrés salino -inducido por la alta presencia de cationes a las levaduras- es mediante co-expresión. Permitiendo encontrar genes nuevos, dentro de aquellos genes que están poco caracterizados a nivel funcional.

Abordándose de esta forma, la solución al problema de encontrar genes que puedan entregar tolerancia a cationes en las levaduras y con la ventaja de otorgar nuevas anotaciones funcionales para genes implicados en homeostasis iónica.

En este proyecto planteamos como primer objetivo, analizar y caracterizar la lista de 12 genes altamente relacionados con transporte iónico, en mayor profundidad, utilizando distintos criterios bioinformáticos que nos permitirán seleccionar entre éstos, aquellos genes más interesantes y con mayor probabilidad efectivamente estar involucrados en el metabolismo iónico.

Posteriormente se realizarán las estrategias moleculares para lograr la clonación y expresión de los genes seleccionados en *Saccharomyces cerevisiae*. Finalmente, se planea someter a las levaduras transformadas a condiciones estresantes de cationes metálicos con el objetivo de determinar el posible efecto en la tolerancia de la transformación de los genes de *Arabidopsis thaliana* en las levaduras.

HIPÓTESIS

Productos proteicos de genes de *Arabidopsis thaliana* identificados por coexpresión génica y contagiados por el GO *transporte iónico*, aumentan la tolerancia al estrés iónico de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad de productos génicos de genes candidatos de la red de coexpresión de *A. thaliana* para aumentar la tolerancia a estrés iónico de *Saccharomyces cerevisiae*

Objetivos específicos

- 1.- Seleccionar genes de *A.thaliana* de la red de coexpresión relacionados a transporte iónico utilizando bibliografía, herramientas bioinformáticas y análisis de datos de microarreglos.
- 2.- Generar cepas de *S. cerevisiae* que expresen los genes seleccionados de *A. thaliana* relacionados a transporte iónico.
- 3.- Determinar si existe tolerancia de *S. cerevisiae* transformantes a condiciones de estrés iónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Análisis bioinformático y análisis bibliográfico

Se realizó una búsqueda bioinformática de la base de datos *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR), publicada en la página web www.arabidopsis.com. En dicha base de datos se buscaron las descripciones y características de los genes seleccionados (ITRG: Ion Transport Related Gen).

Para seleccionar los genes a ser estudiados desde la lista disponible, se efectuó un histograma con los vecinos de los ITRG en esta red, donde se investigó los datos correspondientes a las características y abundancias de las distintas anotaciones en la base de datos "*The GO consortium*", publicada en la página web www.geneontology.com (Gene y Consortium, 2000).

Con el objetivo de poseer la mayor cantidad de antecedentes posibles de los genes estudiados, se realizó un análisis con varias herramientas bioinformáticas, que permitieran realizar predicciones sobre localización subcelular y posibles segmentos transmembrana utilizando distintos parámetros. Los programas utilizados se muestran en la tabla 1, donde además se detallan los métodos y parámetros que cada uno emplea para hacer las predicciones

Tabla 1. **Herramientas bioinformáticas empleadas para realizar predicciones de localización subcelular.** k-NN: k Nearest Neighbor y PNN: Probabilistic Neural Network.

Herramienta de predicción bioinformática	Descripción del método	Referencia asociada
WoLF-PSORT	Análisis de la composición de la secuencia aminoacídica y motivos.	(Horton et al., 2007)
SVMtm	Predicción de dominios transmembrana	(Yuan et al., 2004)
ESLpred	Predicción mediante alineamientos aminoacídicos y propiedades fisicoquímicas	(Bhasin and Raghava, 2004)
TMHMM	Predicción de dominios transmembrana (evalúa la formación de α -hélices)	
Plant-mPloc	Integra datos del GO, dominios funcionales, composición de aminoácidos	(Chou and Shen, 2010)
Y-loc	Busca señales de localización subcelular o motivos relevantes para la señalización de proteínas.	(Briesemeister et al., 2010)
SubcellProt	Utiliza algoritmos probabilísticos (k-NN y PNN).	http://www.bioinfo.de
EpiLoc	Localización subcelular basado en análisis de secuencias.	(Brady and Shatkay, 2008)
SherLoc2	Localización basada en análisis de secuencia y perfiles filogenéticos.	(Briesemeister et al., 2009)

2.1.1 Análisis de perfiles de expresión de plantas sometidas a estrés salino y estrés osmótico.

Con la finalidad de estudiar el perfil de expresión de todos los genes correspondientes a plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino y estrés osmótico, desde los datos de microarreglos disponibles en la base de datos NASC (Craigon y cols., 2004). Se utilizaron los datos correspondientes a experimentos de plantas sometidas a estrés salino (NaCl 150mM) y estrés osmótico (Manitol

300mM). Los datos empleados corresponden a los experimentos publicados como: AtGenExpress Stress Treatments (Control plants), AtGenExpress Stress Treatments (Salt stress), AtGenExpress Stress Treatments (Osmotic stress). Para ambos estreses se evaluaron los siguientes tiempos: 0; 0,5; 1; 3; 6; 12 y 24 h (AtGenExpress Consortium.). Los tres grupos de experimentos corresponden a 84 chips ATH1 Affymetrix™ donde se incluyen los distintos tiempos de exposición a los distintos tratamientos (control, estrés osmótico y estrés salino), dos tipos de tejido (parte aérea y raíz) y una réplica técnica en cada caso. Para poder realizar el análisis de los datos, se verificó la calidad de los microarreglos, para que los datos fueran comparables entre sí. La normalización se realizó mediante el método de *Robust Multichip Average* o RMA (Irizarry, 2003).

Los datos obtenidos corresponden a dos réplicas experimentales en cada caso. Los valores de estas réplicas fueron promediadas, posteriormente, cada promedio correspondiente a las expresiones génicas registradas en cada tratamientos fueron normalizados punto a punto por su respectivo valor en los controles. Mostrándose los resultados mediante expresión relativa a través del tiempo.

2.2.1.1 Tejido Vegetal

Se sembraron semillas de plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 (Col-0) en lana de roca como soporte, nutrido mediante medio hidropónico concentración 1X (Tabla 2). Estas fueron incubadas en un ambiente controlado: con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y temperatura de 22°C. Luego de 3 semanas desde la germinación de las semillas, fue colectado tejido de hojas de la roseta y hojas caulinares. El tejido fue congelado y guardado a -80°C hasta ser utilizado.

Tabla 2: **Medio hidropónico de cultivo de plantas(100X)**: Esta solución se prepara concentrada para luego ser diluida hasta una concentración de 1X para incubar las plantas hidropónicamente. Los reactivos se agregaron secuencialmente en el orden indicado. Previamente, se debe disolver el reactivo 2 separadamente en agua destilada y se agrega lentamente. Antes de añadir el reactivo 10, el volumen debe ser de 900 mL y se lleva el pH a 5 con KOH 10 M, para obtener un pH final de 6 (Gibeaut, 1997).

Nº	Reactivo	Concentración final de uso (1X)	Masa (g) para 1 L 100 X
1	KNO ₃	125 mM	12.640
2	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	150 mM	35.430
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	75 mM	18.490
4	KH ₂ PO ₄	50 mM	6.800
5	KCl	5 mM	0.370
6	H ₃ BO ₃	5 mM	0.310
7	MnSO ₄	1 mM	0.150
8	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	200 µM	0.060
9	CuSO ₄	150 µM	0.024
10	Na ₂ O ₃ Si	10 mM	1.22
11	Fe/DTPA	10 mM	3.640

2.2.1.2 Cepas Bacterianas

Para realizar las amplificaciones de los diferentes constructos utilizados en este trabajo, se emplearon las células Match 1 (Invitrogen), las cuales son *Escherichia coli* tratadas químicamente, para hacerlas competentes. Estas permiten una eficiente transformación, además de un crecimiento más rápido en comparación a

otras células disponibles en el mercado para dicho proceso. Estas células se almacenan a -80°C hasta ser utilizadas.

2.2.1.3 Levaduras

Se emplearon levaduras de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 cuyo genotipo es

(*MA Ta/α his3Δ1/his3Δ1leu2Δ0/leu2Δ0LYS2/lys2Δ0met15Δ0/MET15ura3Δ0/ura3Δ0*).

2.2.2 Diseño y ejecución de construcciones moleculares y la posterior evaluación en levaduras.

2.2.2.1 Extracción, verificación y cuantificación de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex), especialmente diseñado para la extracción de RNA en tejidos vegetales ricos en azúcares y/o fenoles. Se molió el tejido vegetal, previamente congelado a -80°C , utilizando nitrógeno líquido para evitar la degradación de los ácidos nucleicos. Una vez eluido el RNA en agua libre de nucleasas proporcionada por el kit, fue almacenado a -80°C hasta su utilización. La calidad del RNA extraído se verificó a través de dos métodos, mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones denaturantes y por espectrofotometría.

Para confeccionar el gel en condiciones denaturantes se modificó el protocolo de Sambrook y Russell, 2001. Se preparó un gel 1,5% agarosa, 10% v/v de MOPS10X (MOPS 400mM, EDTA 10mM-pH8-, CH_3COONa 100 mM), 0,03% v/v de CH_2O . 10% completándose el volumen con agua tratada con DEPC. Las muestras se prepararon con 0,5-1 μg de RNA (1uL), 1uL de Bromuro de Etidio 25 Mm y 1 uL de tampón de carga 3X (Winkler). En el gel previamente enfriado se cargaron las muestras, luego se corrió en MOPS 1X (diluido desde el 10X con agua tratada con DEPC) durante 45 min a 70 Volts. Los geles fueron observados y fotografiados bajo

luz UV en un transiluminador con cámara fotográfica incorporada (GeneGenius Classic de SynGene®).

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron con un equipo Nanodrop ND-1000 V3.3. Se evaluó la calidad del RNA, midiendo la absorbancia de las muestras a longitudes de onda (λ) de 230, 260 y 280 nm. El programa asociado a este espectrofotómetro permite obtener las razones 260/280 y 260/230 que se emplean para evaluar la pureza de las extracciones de RNA. Un valor de la relación 260/280 cercano a 2.0 indica extracciones puras de RNA, valores más bajos que estos, señalan la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben a 280 nm. La relación 260/230 para muestras de RNA comúnmente están en el rango de 1.8 y 2.2. Valores más bajos revelan la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas (Fleige and Pfaffl, 2006, Sambrook y Russell, 2001). Se utilizaron muestras de RNA que se encontraban que mostraban un valor de 2 para ambas razones.

Para eliminar posibles residuos de DNA genómico en las muestras de RNA extraídas desde plantas silvestres previamente, se realizó un tratamiento con la enzima DNAsa I (Fermentas). Donde se tomaron en 7,5 μ L (90ng/ μ L) de RNA, 1 μ L de enzima (1U de DNAsa I) y 1 μ L del tampón 10X de la DNAsa I con $MgCl_2$ (Fermentas), además de 0,25 μ L de inhibidor de RNAsas Ribolock™, (10U, de Fermentas). La mezcla se incubó por 20 min a 37°C. Posteriormente se inactiva la DNAsa adicionando a cada tubo de reacción 1 μ L de EDTA 25mM incubando las muestras durante 15 min a 65°C.

2.2.2.2 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Para llevar a cabo el RT-PCR se empleó el termociclador MyCycler™ (BIO-RAD). En cada reacción se mezclaron 5,5 µL del RNA tratado con DNAsas con 1µL del partidor “oligo AP” (5' CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'), esta mezcla fue puesta en el termociclador, incubándose por 5 min a 70°C. Luego en hielo por otros 5 min. Pasado este tiempo, a cada tubo se le agregan los demás reactivos que permiten la reacción: 1µL de la enzima transcriptasa reversa RT-Improm II (Promega), 4 µL de amortiguador 5X de enzima RT (Promega), 5,2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1µL de dNTPs (preparados en agua previamente tratada con DEPC) 10 mM y 0,5 µL (20U) de inhibidor de RNAsas Ribolock™ (Fermentas). Se realizó el protocolo recomendado por Promega (indicado en la Tabla 3).

Tabla 3:**Programa para realizar la transcripción reversa.** En la tabla se indican los segmentos del protocolo de la transcripción reversa: primero se realiza la inactivación de las DNAsas (DNasa I), posteriormente se aparean los oligos AP a los RNA mensajeros, luego un tercer segmento de extensión de la enzima transcriptasa reversa (TR), terminando con la inactivación de la enzima, para obtener un producto puro para la amplificación mediante PCR. Se señala la duración de cada uno de los pasos y las temperaturas a las cuales fueron incubadas las muestras de RNA en el termociclador.

RT-PCR	Segmentos	Paso	Tiempo	Temperatura (°C)
	Inactivación de DNAsas	1	5 min	70
		2	5 min	4
	Unión de los RNAs con el oligo AP	3	5 min	25
	Extensión	1	60 min	42
	Inactivación de TR	2	15 min	70

2.2.2.3 Diseño de partidores.

Se diseñaron partidores para los genes estudiados, contemplando la utilización de la tecnología Gateway (INVITROGEN) para el clonamiento y posterior expresión de proteínas de fusión. Los partidores se diseñaron tomando como molde las secuencias CDS (CoDing Sequence) de genes de *Arabidopsis thaliana*, depositadas en la base de datos www.tair.org. Los genes estudiados se denominaron Ion Transport Related Genes (ITRG) 1, 2 y 3. Los partidores amplifican el marco de lectura abierto completo de cada gen. Debido a que se desea construir proteínas de fusión, con etiquetas en el extremo carboxilo terminal, se diseñaron eliminando el codón de termino (TGA, TAA o TAG) del CDS. Este codón se reemplaza por un codón que codifique para un aminoácido con una cadena radical pequeña (glicina o serina) y no cargada, de tal forma de evitar alteraciones en la conformación de la futura proteína de fusión. En la Tabla 4 se muestran los partidores diseñados.

Tabla 4: **Partidores.** Se muestran los partidores diseñados para la amplificación de los fragmentos de interés y su posterior clonación. ITRG: Ion Transport Related Gen, los seleccionados en este trabajo son ITRG1, ITRG2 e ITRG3.

Genes	Partidores
ITRG 1	F 5'GAT TCG ATC AAG GAA ATG GCG TAC 3'
	R 5'TGA GAT GAA GTT ACG GAT GTC TAG 3'
ITRG 2	F 5'AAC ACG ATG GGA ACA ATG GGT AAA GC 3'
	R 5'TCC AGC TGC TTT TGG TAC ATT CTC 3'
ITRG 3	F 5'ATG TTT CTA CGG GCA ATC GGA3'
	R 5'TCC CTC CTT CAA CTG CGG ATC GCT3'

2.2.2.4 Amplificación de los fragmentos para la clonación.

La amplificación de los fragmentos para la clonación se lleva a cabo mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). Como resultado de la transcripción reversa, se obtiene una mezcla de cDNAs correspondiente a la población de mRNA en el momento en que se colectó el tejido. Estos cDNAs se utilizan como hebras moldes para la amplificación mediante PCR. Para amplificar los genes de interés se empleó un protocolo estándar de PCR: denaturación inicial: 95°C por 2 mins, luego 33 ciclos de: denaturación a 94°C por 30 seg, 1 min de hibridación con los partidores (el fabricante de la enzima recomienda 5°C menos de la temperatura de disociación de los partidores (T_m), esto se estandariza en cada caso) y extensión a 72°C por 45 segundos. Finalmente un período de 10 min a 72°C como extensión final. Para realizar las clonaciones se amplificaron los fragmentos de interés con la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Fermentas). La reacción general llevada a cabo para amplificar los genes fue amortiguador sin $MgSO_4$ 1X, $MgSO_4$ 2 mM, dNTPs 0,4 mM, *Pfu* 0.05 U/ μ L, 1 μ L de cDNA, partidore directo 0,2 mM de y partidore reverso 0.2 mM, completándose el volumen total a 25 μ L con agua nanopura. Para utilizar la tecnología Gateway se necesitan secuencias amplificadas con extremos cohesivos, con una Adenina (A) desapareada en cada extremo 3' del amplificado. Debido a que la enzima *Pfu* genera extremos romos, después del PCR con esta enzima, para la adhesión de la adenina se realiza una incubación de 15 min a 72°C agregándole a cada tubo 1 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ L de dATPs y 0,2 μ L de Taq DNA polimerasa (Biolasa, Bioline).

La tecnología Gateway contempla la clonación de los fragmentos de interés en un vector de entrada. Posterior a esto, mediante enzimas, endonucleasas, se puede

realizar la recombinación en sentido con una gran variedad de vectores de expresión. Esto permite hacer pruebas de expresión en muchos sistemas al mismo tiempo, además de producir varios tipos de vectores con o sin promotor, con distintas etiquetas (HIS, HA, EGFP, etc) para hacer proteínas de fusión, fusiones en el N- o C-terminal, etc.

2.2.2.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para visualizar fragmentos de DNA provenientes de digestiones, PCR, las extracciones de DNA plasmidial, etc, se realizó electroforesis en geles de agarosa. Esta electroforesis se lleva a cabo en el amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8). Se prepararon geles de agarosa de distintas concentraciones según el caso (0.8-2% agarosa en TAE 1X), realizando la electroforesis en promedio por 40 min a 100 V. Posteriormente se incubó el gel en una solución de bromuro de etidio 25mM por 20 min. Se visualiza el ADN, utilizando UV en el equipo transiluminador con cámara fotográfica incorporada (GeneGenius Classic de SynGene®). Las muestras de DNA contiene solución amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilen cyanol 0.25% y glicerol 80%) para lograr la visualización de la muestra y que esta se ubicara en el fondo de cada pocillo. Se utilizaron los estándares de peso molecular Ladder GeneRuler™ de 100pb y de 1Kb (Fermentas).

2.2.2.6.1 Clonación

El vector de entrada gateway seleccionado fue pCR8/GW/TOPO de 2817 pb (INVITROGEN). Este vector (figura 3) posee resistencia al antibiótico espectinomina, lo cual proporciona un método de selección para bacterias transformantes. Para realizar una clonación en este vector, es necesario un fragmento que posea una base A desapareada en el 3' de cada extremo, ya que el vector posee la base Timina (T) en los sitios de recombinación *attL1* y *attL2*, lugar donde se inserta el fragmento de interés. En los sitios *attL1* y *attL2* se encuentra unida la enzima Topoisomerasa I que cataliza la reacción para ligar el segmento a clonar en el vector. Para la ligación se utilizó entre 150 y 200 ng totales de inserto, 0.5 μ L de solución salina (incluida en el kit), 0.5 μ L de vector pCR8/GW/TOPO, además del agua necesaria para completar 3 μ L. Esta mezcla se incubó a 25°C por 2 a 6 h.

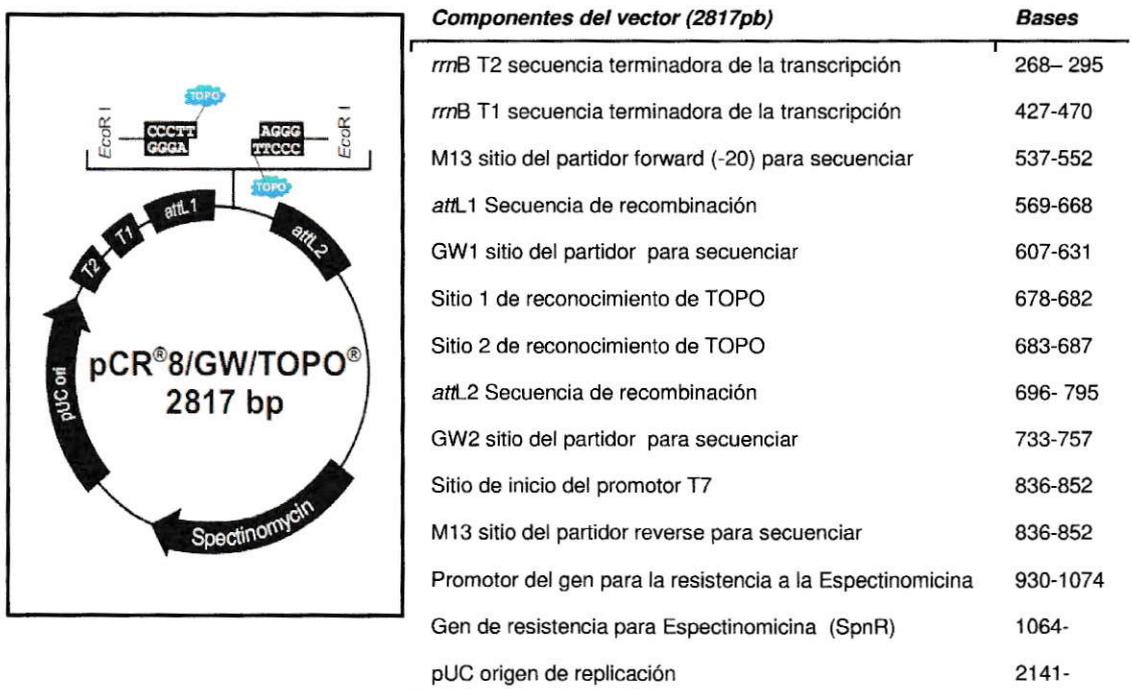


Figura 3: **Vector de entrada pCR8/GW/TOPO.** En la figura se muestra un esquema general de las características del vector. A la derecha se indica la ubicación de las secuencias de interés que posee el vector. Datos modificados del manual de INVITROGEN.

2.2.2.6.2 Transformación de células competentes

Para transformar las distintas ligaciones (vector con inserto), se prepararon células quimiocompetentes, las cuales se trataron con sales de calcio para hacerlas sensibles a la transformación mediante estrés de temperatura. También se emplearon células competentes de Invitrogen (Mach1). Una vez realizada la ligación del fragmento de interés en el vector pCR8 se procede a la transformación, donde se tomaron 200 μ L de células quimiocompetentes y se mezclaron junto con la ligación de interés, incubándose 45 min en hielo. Posteriormente, se les dio un estrés térmico a 42°C por 75 s y rápidamente se vuelven a incubar en hielo. Para permitir la recuperación de aquellas células que hayan sobrevivido al estrés térmico aplicado, se dispuso de un tubo con 1 mL de Luria -Bertani (LB: triptona 1%p/v, extracto de levadura 0,5%p/v, NaCl 1%p/v) al cual se le agregó la reacción de transformación y se dejaron crecer con agitación por 1 hora a 37°C. Luego de ese tiempo, se tomó una alícuota de 100 μ L y se distribuyó uniformemente en una placa de agar LB conteniendo el antibiótico de selección correspondiente (espectinomicina, ampicilina o kanamicina según correspondiera) en una concentración final de 100 μ g/mL. El cultivo restante se sedimentó en la centrifuga a 3.000 rpm por 4 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspende en un volumen mínimo, que se dispone en una nueva placa de LB-agar 1,5%p/p conteniendo el antibiótico de selección. Ambas placas se incuban a 37°C durante 16 h. De esta forma, si es que la clonación fue eficiente se podrán identificar colonias aisladas si es que la clonación fue de alta eficiencia (en las placas donde se sembró el cultivo sin sedimentar) o baja (mayormente en las placas cuyo cultivo fue previamente sedimentado). Luego se evaluaron aquellos clones que hayan

resultado con una transformación exitosa, es decir, se analizaron las colonias encontradas en las distintas placas.

2.2.2.7 Identificación de bacterias transformantes

En esta sección se ejemplificará este procedimiento con la clonación de una ligación realizada con el vector pCR8. Todas las transformaciones en bacterias se realizaron de la misma manera. El método de selección de bacterias transformantes para todos los casos de las transformaciones se realiza mediante resistencia a antibióticos. Una vez realizada la transformación en las células competentes Mach1 (Invitrogen), se siembran en una placa de LB-agar 1,5% suplementada con el antibiótico espectinomicina a una concentración final de 100 µg/mL (el vector pCR8 proporciona resistencia contra este antibiótico), se incuban en una estufa a 37°C por 16 horas y se evalúan las colonias existentes. Como primer método de selección se utilizó el análisis rápido de colonias mediante PCR. En esta técnica se pican las colonias y se resuspenden en 10 µL de agua nanopura estéril. Desde esta dilución se tomó 1 µL para realizar un PCR convencional, para verificar la presencia del inserto de interés en el DNA plasmidial. Aquellas colonias que resultan positivas al PCR se crecen en 5 mL de LB-líquido suplementado con espectinomicina 100 µg/mL, durante 16 horas a 37°C en agitación constante. Luego de esto, se realizó una extracción de DNA plasmidial mediante el kit AXYPREP plasmid miniprep (AXIGEN). A esta muestra de DNA se le hicieron los análisis para asegurar que se haya clonado el segmento de interés. Además que se encuentre en el sentido correcto. Se evalúa la presencia de mutaciones durante la amplificación por PCR mediante secuenciación del tipo Sanger.

El primer análisis que se realizó, fue digestiones enzimáticas utilizando endonucleasas de restricción, donde se incuban los vectores con diferentes enzimas para obtener distintos fragmentos que permitan la discriminación de un gen clonado en sentido con respecto al promotor frente a uno en antisentido. Además de esta manera se puede confirmar que se trata de un fragmento que tiene un patrón de restricción coincidente con el esperado. Posteriormente se observaron los distintos patrones de digestión mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para confirmar la correcta clonación del marco de lectura abierto de interés y evaluar la presencia de mutaciones, los clones se mandaron a secuenciar mediante Secuenciación capilar de Sanger, utilizando partidores que hibridan con el vector pCR8 en sitios externos a los fragmentos clonados (M13 y M13pUC) a la empresa Macrogen. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos, utilizando Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y posterior alineamiento utilizando la herramienta en línea ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Se verificó que los fragmentos clonados tuviesen la secuencia correspondiente al codón de inicio (ATG) en sentido con los sitios de clonamiento, y se comprobó que no hubiera mutaciones con respecto a la secuencia depositada en la base de datos para cada gen. Además de que se haya realizado el correcto reemplazo del codón de término, para permitir la expresión de la proteína de fusión proyectada.

2.2.2.8 Recombinación

Una vez completada la revisión de los clones de interés, se realizó la recombinación con vectores de expresión (vectores de destino). Se utilizó la enzima LR clonasa (INVITROGEN), esta enzima reconoce los sitios attL1 y attL2 del vector de entrada pCR8 y cataliza la recombinación con los sitios attR1 y attR2 de los distintos vectores de expresión. Para este procedimiento se mezclan aproximadamente 200 ng del vector de entrada conteniendo el gen de interés, más 100 ng aproximadamente del vector de destinación, completando a un volumen final de 8 μ L con Tampón TE pH 8.0. Paralelamente, antes de utilizar la enzima, el tubo de la enzima LR clonasa se mezcla fuertemente y luego se mantiene en hielo. Para realizar la recombinación, se le agrega 1 μ L de LR clonasa a cada muestra de vectores, se mezclan enérgicamente y se resuspende repetidas veces. Para darle tiempo al proceso de recombinación, se incuba por 2 horas a 25°C. Finalmente, para inactivar la recombinasa, se le agrega a la solución 1 μ L ($1\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$) de Proteinasa K (INVITROGEN), incubándose 10 min a 37°C.

Se emplearon los vectores de expresión con promotores de levaduras: pYES-DEST52 Gateway (INVITROGEN), además de pAG426GPD-ccdB-HA y pAG426GPD-ccdB-GFP (Addgene Plasmid Repository). El vector pYES-DEST52 posee un promotor inducible por galactosa, secuencias que codifican para un epítopo de histidina (HISx6) y un epítopo V5 de manera de generar proteínas etiquetadas en el extremo carboxilo. Mientras que los otros dos vectores tienen un promotor de expresión constitutiva, además de una secuencia que codifica en el extremo 3' para el epítopo HA (Hematoglutinina A) y EGFP (*Enhanced Green*

Fluorescent Protein) respectivamente. Los tres vectores otorgan resistencia al antibiótico ampicilina en bacteria (ver figura 4).

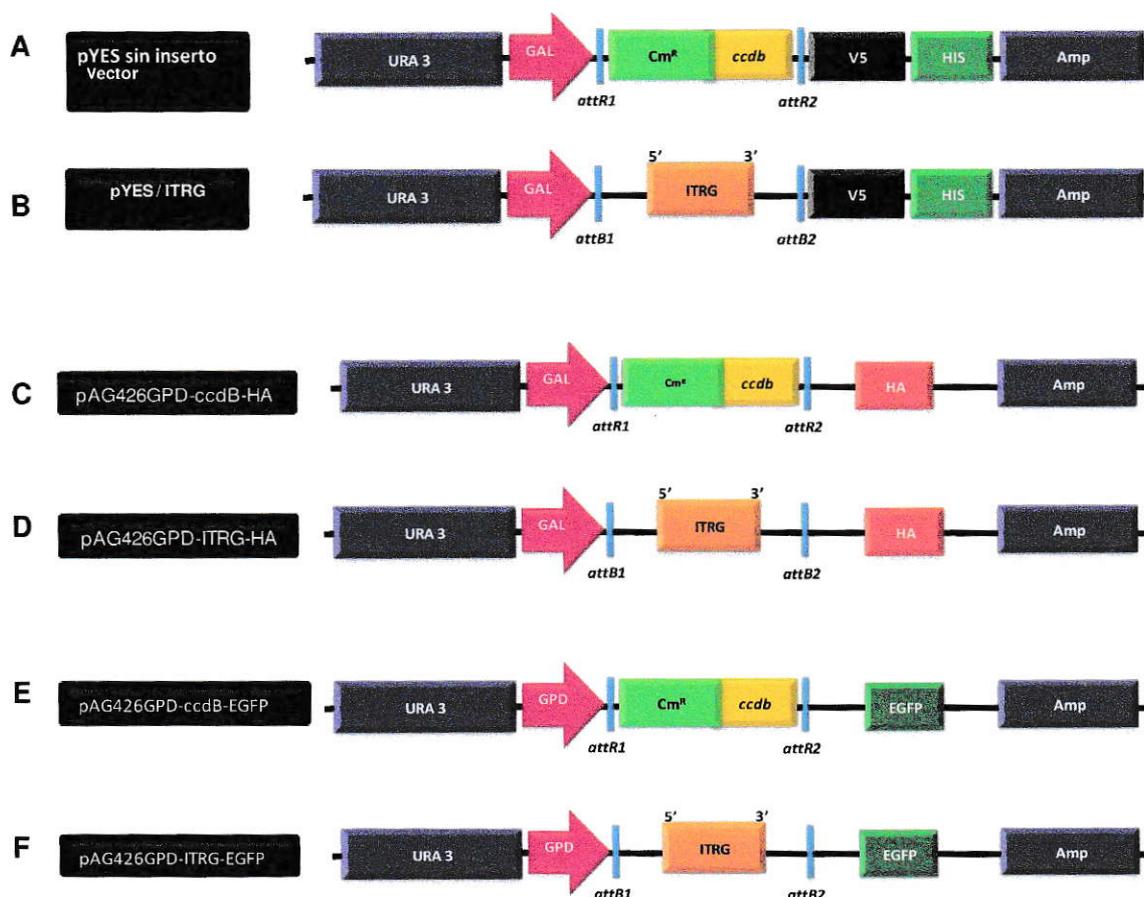


Figura 4: **Vectores GATEWAY de expresión en levadura previa y post recombinación homóloga.** Se muestra el esquema de los vectores utilizados para la expresión de distintos genes en levaduras. En cada caso se muestra en primer lugar los vectores sin inserto y luego la forma post recombinación con pCR8-ITRG. A corresponde al vector pYES-DEST52, B al vector pYES-ITRG, C al vector pAG426GPD-ccdB-HA, D al vector pAG426GPD-ITRG-HA, E al vector pAG426GPD-ccdB-GFP, mientras que F al vector pAG426GPD-ITRG-GFP. URA 3: secuencia génica que codifica para la enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, enzima clave en la biosíntesis de pirimidinas en *S.cerevisiae*. Se utiliza como marcador de selección en la transformación de cepas de *S.cerevisiae* auxotrofas para Uracilo; GAL: promotor inducible por galactosa; GPD: Promotor constitutivo del gen de la enzima Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; V5: secuencia que codifica para el epítopo (proteína del virus del simio 5) reconocible por un anticuerpo comercial; HIS: secuencia que codifica para un epítopo de seis histidinas detectable por un anticuerpo comercial; HA: secuencia que codifica para el epítopo de hemaglutinina A, reconocible por un anticuerpo comercial; EGFP: secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde de eficiencia aumentada. Cm^R: secuencia génica que entrega resistencia al antibiótico cloranfenicol; Amp: secuencia génica que entrega resistencia al antibiótico ampicilina; ccdB: secuencia génica que codifica un producto proteico tóxico para algunas cepas bacterianas para evitar la selección de bacterias que posean el vector sin inserto.; attR1y attR2: sitios de recombinación de los vectores de expresión; attB1 y attB1:sitios de recombinación de los vectores de expresión posteriores a la recombinación; ITRG: Ion Transport Related Gene

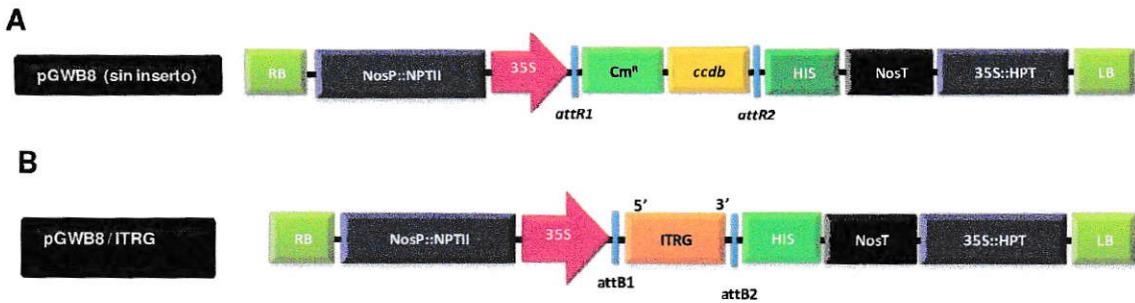


Figura 5: Vectores de expresión de proteínas de fusión en plantas. Se muestra un esquema del vector utilizado para la sobreexpresión de distintas proteínas en plantas. A corresponde al vector pGWB8 y B corresponde a la construcción resultante de la recombinación del vector pGWB8 con los distintos ITRG. 35S: Promotor constitutivo del gen del virus del Mosaico de la coliflor; (HIS x6): secuencia que codifica para un epítipo de seis histidinas detectable por un anticuerpo comercial, Cm^R: secuencia génica que codifica para la resistencia al antibiótico cloramfenicol; NosP::NPTII: secuencia promotora de la nopalina sintasa y secuencia génica que codifica para la resistencia al antibiótico kanamicina; ccdB: secuencia génica tóxica para algunas cepas bacterianas; attR1 y attR2: secuencias de recombinación de los vectores de expresión previa recombinación; attB1 y attB1: secuencias de recombinación de los vectores de expresión posteriores a la recombinación; NosT: secuencia génica terminadora de la traducción; 35S::HPT: secuencia promotora y secuencia génica que otorga resistencia contra el antibiótico higromicina; LB y RB: extremos del T-DNA que permiten la inserción en el genoma en el DNA de la planta transformada; ITRG: Ion Transport Related Gene.

Paralelamente, con el objetivo de sobre expresar los ITRG en plantas en el futuro, se utilizó el vector de expresión pGWB8, el cual posee un promotor constitutivo fuerte 35S, además de una secuencia que codifica para un epítipo de 6 histidinas. Este vector otorga resistencia en plantas y bacterias al antibiótico kanamicina, mientras que también otorga resistencia contra al antibiótico higromicina en plantas (Figura 5).

2.2.2.9 Transformación de levaduras

2.2.2.9.1 Preparación de levaduras competentes

Para verificar el efecto que causan los genes estudiados en esta tesis, se transformaron los vectores de expresión en la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* BY4743. Como control se transformó levaduras con los vectores sin inserto.

Para transformar las levaduras se utilizó el método de electroporación, haciendo levaduras competentes para transformación. Se inoculó la cepa BY4743 en 100 mL de YPD (1% Extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) .Este inóculo se incubó a 28°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600nm entre 1,3-1,5. El cultivo se sedimentó a 5000 rpm por 5 min a 4°C y posteriormente se lavó con agua estéril y fría (se repitió eliminando el agua, conservando el sedimento). El sedimento de células se resuspendió en 4mL de sorbitol 1M (estéril y frío), luego se sedimentó a 5000 rpm, por 5 min a 4°C, finalmente se suspendieron las células en 100 µL de sorbitol 1M. Almacenando las células a 4°C hasta su uso.

2.2.2.9.2 Incorporación de las distintas construcciones en levaduras

Para realizar la transformación se mezcló una alícuota de células competentes (sección 2.2.2.9.1) con 100 ng de DNA solubilizado en 0,1- 5 uL de tampón TE o agua nanopura desionizada. Si el DNA no proviene de una extracción plasmidial por kit directamente, es necesario un paso de diálisis con membranas de nitrocelulosa en agua desionizada, durante 20 min. Esta mezcla se agregó a la cubeta de electroporación y se incubó por 4 min en hielo. La electroporación se lleva a cabo

en el equipo Gene Pulser Xcell Electroporation System (BIORAD). Los parámetros utilizados para la electroporación son: 1,5kV, 25 μ F y 200 Ω , por un periodo entre 4,5-5 ms. Posteriormente con el objetivo de permitir la recuperación de las levadura, estas se incuban en 1 mL de YPD por 1h con agitación a 28°C. Después de esto, el tubo se centrifuga a 3.000 rpm por 4 min y se lava el sedimento con medio mínimo de levadura, YMM (Yeast Minimal Medium: YNB -Yeast Nitrogen Base- 0,8%, (NH₄)₂SO₄0,5%, glucosa 2% y aminoácidos indicados en la tabla 4). Se toman 100 μ L de cultivo y se siembran en una placa YMM-agar. Los 900 μ L restantes se sedimentan y finalmente, se resuspende en un volumen mínimo para ser también sembrado. Estas placas de YMM-agar se incuban a 30°C durante 48 h. Luego se analizan las colonias obtenidas, donde cada una de ellas corresponde a una célula transformada con un plasmidio, permitiéndole crecer en el medio de selección por auxotrofia. Con los distintos clones obtenidos se realizaron pruebas de tolerancia a cationes metálicos.

Tabla 5: **Aminoácidos que contiene el medio mínimo YMM.** El medio mínimo de cultivo de levaduras utilizado posee aminoácidos en dos concentraciones distintas, se muestra la lista de aminoácidos 1, en la cual se debe agregar cada aminoácido a una concentración final de 0,1g/L, mientras que en la lista de aminoácidos 2, la concentración final de cada uno es de 0,05g/L.

Aminoácidos 1 0,1g/L	Aminoácidos 2 0,05g/L
Adenina	Ácido aspártico
Arginina	Histidina
Cisteína	Isoleucina
Leucina	Metionina
Lisina	Fenilalanina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
*Uracilo	Tirosina
	Valina

2.2.2.10 Ensayos de tolerancia a cationes metálicos en *S. cerevisiae*

Para determinar la tolerancia de las levaduras transformadas con las distintas construcción es en medios con cationes metálicos, se montó un ensayo de crecimiento en placas de 96 pocillos. Se realizaron dos protocolos distintos, dependiendo del vector con el que estaban transformadas las levaduras, siendo la mayor diferencia los tiempos de inducción necesarios para las levaduras transformadas con las construcciones que incluyeran el vector pYES-DEST52, mostrado en la figura 6.

Se crece una cepa transformada en 5-10 mL de YMM para permitir que las levaduras se multipliquen. Luego de dos días en agitación constante, a 28°C, se toma la cantidad de cultivo necesaria para obtener un cultivo de levaduras en YMM rafinosa (Yeast Minimal Medium: YNB -Yeast Nitrogen Base-0,8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, rafinosa 2% y aminoácidos indicados en la tabla 4) con una OD600nm de 0.5. La

rafinosa es un azúcar que no afecta la actividad del promotor gal, en cambio la glucosa lo reprime. El cultivo se incubó por 48 h en agitación constante a 28°C, donde finalmente, se realiza un procedimiento similar al anterior, pero esta vez se pasa desde YMM rafinosa a YMM galactosa (Yeast Minimal Medium: YNB -Yeast Nitrogen Base-0,8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, galactosa 2% y aminoácidos indicados en la tabla 5). Este nuevo inóculo se mantiene a 28°C, en agitación constante durante 6 h permitiendo la activación del promotor. Una vez transcurrido el tiempo, se inocularon placas de 96 pocillos con 100 μL de cultivo de cada transformante, 50 μL de una solución estéril de catión metálico en agua 4X (para lograr una concentración final en los pocillos de 1X) y 50 μL de YMM galactosa 2X (para mantener constante la concentración inicial del medio del cual provenían los cultivos, evitando el efecto de dilución). Las placas se mantuvieron en agitación constante a 28°C, realizando mediciones cada 2 h. Los experimentos se hicieron con dos réplicas biológicas, y 3 réplicas técnicas por vez. En la tabla 6 se muestran los cationes metálicos utilizados y sus respectivas concentraciones. Se escogieron estos iones debido a que se ha descrito su mecanismo de acción en plantas y dado la posible reacción de las plantas se podría inferir una probable función de los productos génicos codificados por los ITRGs. Estos metales se encuentran presentes además, en diversos procesos industriales, contaminando las zonas donde se podría encontrar una aplicación directa a los productos génicos, relacionada con la biorremediación. Además se utilizaron 3 concentraciones, una que afectara el crecimiento de las levaduras controles entre un 20 y 30%, otra que permitiera crecer sólo al 50% de las levaduras y otra concentración que afectara el crecimiento de las levaduras en más de un 80%.

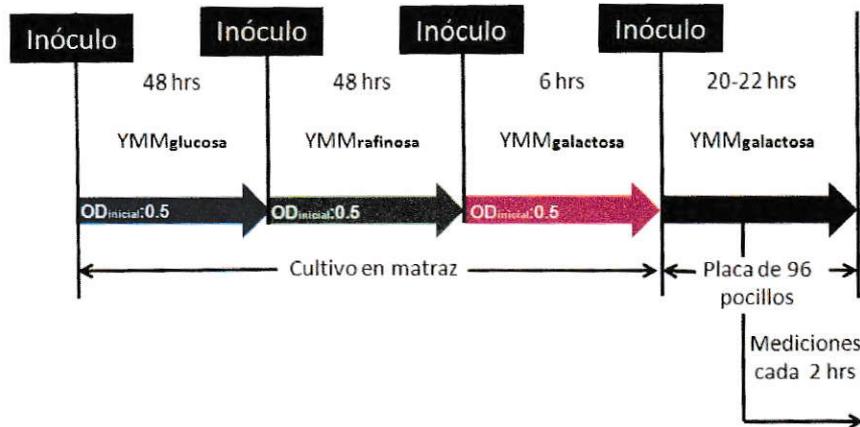


Figura 6: **Protocolo de inducción de las construcciones que poseen el promotor GAL1 transformadas en levaduras.** Se muestran las etapas para realizar la inducción del promotor GAL1 en las construcciones provenientes del vector pYES-DEST52 mediante la incubación con galactosa. Es necesario crecer las levaduras primero en glucosa y luego en rafinosa antes de la inducción por galactosa. OD: densidad óptica medida a 600 nm.

Tabla 6: **Cationes metálicos utilizados para los ensayos de tolerancia de *S.cerevisiae*.** Se evaluó el comportamiento de las distintas levaduras transformantes frente a Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} . Se utilizaron las concentraciones finales mostradas en la tabla (1X).

Cationes Metálicos	Concentraciones 1X
NaCl	100mM, 500mM y 1M
ZnCl ₂	500μM, 1mM y 10mM
CuSO ₄	500μM, 1mM y 3mM
CoSO ₄	100μM, 250μM y 500μM
CdCl ₂	25 μM, 50 μM y 75μM

Para las transformaciones realizadas con los vectores pAG426GPD-ccdB-HA y pAG426GPD-ccdB-EGFP el protocolo realizado contempla un periodo previo al tratamiento con cationes metálicos. Se incubaron las levaduras durante 6 horas en agitación constante a 28°C en matraces con YMM. Luego se ajustaron los cultivos a una DO (600nm) de 0,5 para finalmente ser inoculados en las placas de 96 pocillos, empleando las mismas proporciones volumétricas que con las cepas transformadas con pYES-DEST52 (Sección 2.2.2.9.2).

Para la cuantificación de la densidad óptica en las placas de 96 pocillos, se midió la absorbancia a 620nm cada 2 horas utilizando el lector de placas de elisa TECAN infinite F50. Los datos obtenidos del crecimiento de las levaduras transformadas

con las distintas construcciones se expresan relativizados a la DO registrada al inicio de las mediciones de los mismos cultivos con el objetivo de registrar el crecimiento en el tiempo.

2.2.2.11 Análisis de la expresión de proteínas fusionadas a EGFP

Para determinar la expresión de proteínas fusionadas a EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) en las levaduras transformantes, se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 510, excitando con un láser de 488 nm y capturando la fluorescencia emitida con longitudes de onda entre 505 y 530 nm.

Para lograr una buena visualización de la fluorescencia fue necesario adherir las levaduras a los cubreobjetos, agregando a cada cubre objeto 5 μ L de Concanavalina A (Sigma) preparada a 1mg/mL y luego agregando 5 μ L de cultivo en fase exponencial. La Concanavalina A es una lectina que une las manosas de la pared de las levaduras.

2.2.2.12 Expresión de proteínas mediante Western blot

2.2.2.12.1 Extracción de proteínas.

Un cultivo de células en fase exponencial ($DO_{\lambda 600}=3$) se sedimentó a 3.000 xg por 10 min (4°C) y se lavó con una solución de azida de sodio (NaN_3) 10 mM. Luego se trataron las células con una solución de lisis en razón de 200mg de células sedimentadas por un mL de solución de lisis, compuesta de: solución de Lisis CellLytic Y (Yeast Cell Lisis/Extraction reagent, Sigma), bolitas de vidrio de 425-600 μ m (Sigma), DTT 7 mM final e inhibidores de proteasas 1X final (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Las levaduras incubadas en esta solución se mantienen en hielo hasta ser sometidas al agitador de alta velocidad con el equipo Mini-Beadbeater-16 (Bio Spec Products Inc.) por 30 segundos y después se dejan 30 segundos en hielo. Este ciclo se repite 7 veces. Posterior a esto, los tubos se sedimentan a 20.000 xg por 10 min (4°C) y se recolecta el sobrenadante donde se encuentran las proteínas.

2.2.2.12.2 Precipitación de proteínas

Para concentrar las proteínas y eliminar los constituyentes del medio que eventualmente interfieren con el ensayo de cuantificación de proteínas se precipitan, para de esta forma, tenerlas libres de interferentes. Para esto se precipitaron las proteínas adicionando dos volúmenes de acetona fría. Se homogenizó la solución y se incubó por 1 h a -20°C, luego se sedimentaron las

proteínas a 20.000 xg por 15 min a 4°C. Finalmente el sedimento se resuspendió con una solución de Tris 125 mM, pH 6.8 y SDS 5%.

2.2.2.12.3 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Lowry modificado con el uso de BCA (Mallia et al., 1985), empleando el reactivo BCA (BCA Protein Assay Reagent -bicinchoninic acid-, Pierce) y CuSO_4 4%. Se mezclaron el reactivo de BCA con el CuSO_4 en una razón de 50:1. Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos, donde se agregó la muestra proteica y la solución de BCA más CuSO_4 en razón de 1:8. Además, en la misma placa, se realizó una curva de calibración empleando la proteína BSA (Bovine serum albumin o proteína de suero bobino) en concentraciones conocidas como patrón. La placa se incubó durante 30 min a 37°C para el desarrollo de color propio de la reacción colorimétrica. Posteriormente se cuantificó la OD (570nm) en el lector de placas TECAN infinite F50.

2.2.2.12.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS- PAGE)

Se realizaron geles de poliacrilamida al 16% mediante la utilización de dos fases: la fase concentradora y la fase separadora. La fase concentradora se preparó con Tris125mM, SDS 0.1%p/v, 15% poliacrilamida (30%p/v Acrilamida/0,8%p/v Bisacrilamida), 4µL de TEMED, 0,0375%p/v de persulfato de amonio, pH 6.8. En tanto que la fase separadora se preparó con Tris375mM, SDS 0.1%p/v, 25% poliacrilamida (30%p/v Acrilamida/0,8%p/v Bisacrilamida-, 10µL de TEMED, 0,075%p/v de persulfato de amonio, pH 8.8). En los geles se cargaron 40µg de

extracto protéico. Los volúmenes de carga se prepararon mezclando los extractos protéicos con solución de carga 5X (Tris-HCl pH 8 60mM, glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 28,8mM, azul de bromofenol 0,1%). Posteriormente esta mezcla se incubó a 95°C por 10 min, con el objetivo de denaturar las proteínas completamente. Se utilizaron los estándares de proteínas pre-teñidos (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas) y regular (PageRuler Unstained Protein Ladder, Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo empleando tampón de corrida (Tris 25mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%p/v) en el equipo Mini-PROTEAN (BIO RAD) con una diferencia de potencial de 70V por 30 min y luego 100V por 150min. Posteriormente se retiraron los geles de los respectivos vidrios y se utilizaron para ser teñidos con azul de coomasie o para realizar western blot.

2.2.2.12.5 Tinción de geles de poliacrilamida con Azul de coomassie

Para verificar la integridad de las muestreas de proteínas los geles se tiñeron con una solución de azul de coomassie (Azul de coomassie 0,2%p/v G250, metanol 20%, ácido acético glacial 0,5%) durante 2h y posteriormente se destiñeron con tampón de desteñido (Metanol 5% v/v, ácido acético glacial 7,5% v/v) durante 24h.

2.2.2.12.6 Western blot

Una vez realizada la electroforesis y por ende la separación de proteínas en el gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para esto se utilizó el equipo de transferencia semi-seca Trans-Blot® SDSemi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO RAD). Se dispuso en el equipo de 3 láminas de

papel filtro consecutivas y luego una de membrana de nitrocelulosa pre-humedecidos con amortiguador de corrida (Tris 25mM, glicina 200 mM, metanol 20%v/v) previniendo la formación de burbujas entre las distintas capas. Posteriormente se acomodó cuidadosamente el gel pre-incubado en amortiguador de corrida por 5 min, de manera de no manchar la membrana. Luego se cubrió el gel con 3 láminas de papel filtro pre-humedecido, eliminando el exceso de amortiguador. Finalmente, se realizó la transferencia por 15min a 15V.

Para determinar la correcta transferencia se realizó una tinción temporal de las proteínas en la membrana, incubándose por 15 min en agitación constante con una solución de rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0,2% p/v, ácido acético glacial 5%v/v). Posteriormente se lava suavemente la membrana con agua desionizada, removiendo el exceso de tinción. Luego se lava la membrana con TBS-T (Tris 10mM, NaCl 150mM, Tween20 0,0005%v/v) hasta que desaparezca la tinción.

Para bloquear la membrana, esta se incubó con una solución de leche 5%p/v en TBS-T en constante agitación durante 2 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada vez con enérgica agitación. Luego se realizó la incubación con anticuerpo primario. Se emplearon dos protocolos distintos. Para el anticuerpo primario anti V5 (α V5, realizado en ratón, Invitrogen) se utilizó una dilución de 1:5000 en una solución de leche al 5%p/v en TBS-T. Mientras que para los anticuerpos primarios anti HA (α HA, realizados en ratón, Invitrogen) y primario anti EGFP (α EGFP, realizados en ratón, Invitrogen) se utilizó una dilución de 1:5000 en una solución de leche al 1%p/v en TBS-T. Las membranas se incubaron con las soluciones que contenían los anticuerpos primarios en agitación moderada durante 2h a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las membranas con

enérgica agitación 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada vez. A continuación se realizó la incubación con anticuerpos secundarios. Se emplearon anticuerpos de dos tipos, para revelar los western blot realizados con proteínas de fusión con el epítotope HA y EGFP se usaron anticuerpos etiquetados con fosfatasa alcalina, mientras que para los western blot realizados con proteínas de fusión con el epítotope V5 se emplearon anticuerpos etiquetados con peroxidasa. Ambos anticuerpos secundarios, producidos en cabra, con la capacidad de reconocer a las IgG de ratón α Mouse-(KPL). La incubación con los anticuerpos secundarios unidos a fosfatasa alcalina se realizó a temperatura ambiente por 2 h o por toda la noche a 4°C con agitación constante. Para los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa, se empleó un protocolo similar. Finalmente, después del tiempo de incubación, en ambos casos, se lavó 3 veces con enérgica agitación con TBS-T durante 10 minutos cada vez.

Para el revelado de los western blot realizados con anticuerpos secundarios unidos a fosfatasa alcalina, la membrana se incubó 2 veces por 5 minutos con tampón alcalino (Tris-HCl100mM, NaCl100mM, MgCl₂5mM, Tween 20 0.05%, pH 9.5). Luego se incubó por hasta 30 min con NBT (*nitroblue tetrazolium*) 0,022% p/v y BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 0,01%p/v solubilizados en tampón alcalino. La reacción se detiene con EDTA 20mM, pH8.

En tanto, el revelado con los anticuerpos unidos a peroxidasa se realizó utilizando el kit de revelado quimiluminiscente SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo scientific). En oscuridad se realizó la mezcla en partes iguales de ambos reactivos proporcionados por el kit de revelado y se dispuso en toda la membrana, incubándose por 2 minutos. Posteriormente se retiró el exceso y se cubrió con una placa plástica translúcida. Sobre esta se situó la placa radiográfica y

se cubrió utilizando el cassette de autoradiografía, realizando exposiciones a distintos tiempos. Finalmente se incubó la placa radiográfica en la solución de revelado D-76 (Jamarca), luego se lavó con agua y posteriormente se incubó con la solución fijadora U-3(Jamarca), lavándose con agua otra vez.

2.3 Tratamientos estadísticos de los datos.

Todos los gráficos mostrados, relacionados con el crecimiento relativos al tiempo inicial de los cultivos de levaduras transformados con los ITRG, con respecto a los cultivos de levadura transformados con vector sin inserto fueron realizados utilizando el promedio de tres réplicas experimentales técnicas, calculándose el error estándar. Para analizar posibles diferencias estadísticamente significativas se utilizó un test de t, con la modificación de Welch, empleando un nivel de significancia (P) de 0,05.

RESULTADOS

3.1 Selección y caracterización de genes de *A.thaliana* relacionados a transporte iónico

3.1.1 Obtención de los genes con mayor probabilidad para estar involucrados en el metabolismo iónico.

El análisis de la red de co-expresión, construida por el Dr. Alexander Vergara en nuestro laboratorio, entregó un listado de 55 nuevos genes de *Arabidopsis* con alta probabilidad de estar involucrados en el transporte iónico (nivel de coeficiente de correlación de 0,6 o superior). Además de un porcentaje de RECALL (%RECALL) adecuado, el cual hace referencia de la reproducibilidad que posee la red diseñada. Entre estos genes, algunos no tienen anotación previa y otros tienen anotaciones para otras categorías de GO. Los 12 genes una correlación de 0,8, indica una alta correlación considerando que el valor 1 corresponde a un 100% de correlación.. Además de poseer un %RECALL aceptable para ser considerado como involucrado en el proceso de transporte iónico, en cada tramo como se indica en la tabla 7.

Tabla 7: **Genes identificados en la red de co-expresión génica como nuevos genes involucrados en transporte iónico (Ion Transport GO term:0006811).** % RECALL es un indicador de la reproducibilidad de los resultados entregados por la red, alcanzando casi el 50% en los genes con mayor índice de correlación. Se emplearon los índices de correlación mayores que cero, por lo tanto, se evaluaron correlaciones en el mismo sentido, ambas expresiones aumentaban o ambas disminuían.

Nº de genes	% RECALL	CUT-OFF
32	33,72	0,6
11	38,66	0,7
12	48,92	0,8

Con los resultados del análisis de vecindario génico utilizando el *GO term: 0006811*, que corresponde a transporte iónico (*Ion Transport*, (Gene and Consortium, 2000)) la red entrega 12 genes con las más altas probabilidades de estar involucrado en transporte iónico en *Arabidopsis*. A estos 12 genes se les denominó Ion Transport Related Genes (ITRG). Con el objetivo de determinar la información disponible de los ITRG hasta el momento del diseño de la red se caracterizaron según la información disponible actualmente en las bases de datos públicas como se detalla en la tabla 8.

Tabla 8: **Información disponible de los ITRG según TAIR.** Los ITRG son los genes que poseen mayor probabilidad de estar involucrados en el transporte iónico según la red y el análisis de vecindarios realizados.

ITRG	Descripción disponible
1	Codifica la subunidad F _{AD} de la ATP sintasa F ₁ F ₀ mitocondrial. Su producto proteico es esencial para la formación del polen. La proteína presenta unión a iones Co, Cu, Zn. Se ha encontrado que está presente en fracciones de mitocondrias, cloroplastos, membrana celular y nucléolo.
2	Codifica para la subunidad γ - de la enzima anhidrasa carbónica. Esta proteína también es parte del complejo NADH deshidrogenasa y está implicada en la fotorrespiración. La proteína se ha encontrado en fracciones de mitocondrias.
3	Codifica para una proteína relacionada a una NADH-ubiquinona oxidoreductasa. Esta proteína se ha implicado en la fotorrespiración. Su producto proteico está presente en fracciones mitocondriales, membranas mitocondriales, cloroplastos, complejo I de la cadena respiratoria y membrana celular.
4	Codifica para una proteína, de la cual se desconocen la función molecular, proceso biológico y ubicación celular.
5	Codifica para una proteína de la familia de proteínas ricas en prolina.
6	Codifica para una proteína con dominio de citocromo P450. Estas proteínas poseen un grupo HEM
7	Codifica para una proteína nodulina del tipo de la familia transportadora (MtN21)/EamA. Su producto proteico está presente en fracciones de sistema endomembrana y en membrana celular.
8	Codifica para una proteína relacionada a proteínas inducidas por respuesta a lesiones. Su producto proteico está presente en fracciones de retículo endoplasmático.
9	Codifica para una proteína de la familia de proteínas con dedos de zinc (dominio tipo C3HC4RING-Really Interesting New Gene-finger)/ proteína de la familia con repeticiones de motivos ankyrin.
10	Codifica para una proteína intrínseca de tonoplasto (AtTIP2;3). Esta proteína transporta amonio (NH ₃) y metilamonio a través de la membrana del tonoplasto. Este gen presenta una regulación de su expresión durante el día y aumenta su expresión en presencia de NH ₃ .
11	Codifica para una proteína sin función molecular, proceso biológico y ubicación celular conocida. (<i>Unknown protein</i>).
12	Codifica para una proteína relacionada a proteínas quinasas. Su producto proteico está presente en fracciones del sistema endomembrana.

Considerando las características expuestas en la tabla 8, los genes se agruparon en 4 categorías: genes que participan en el metabolismo energético (ITRG1, 2 y 3),

genes que codifican proteínas con dominios de interacción con DNA (ITRG 5, 9, 7 y 12), genes cuyo producto génico carece de función conocida (ITRG 4 y 11) y los otros genes (ITRG 6,8 y 10), que carecen de un criterio en común con el resto de los grupos.

3.1.2 Análisis de topología de la red de co-expresión génica de *Arabidopsis thaliana*

Con el objetivo de estudiar el entorno topológico de cada ITRG en la red co-expresión génica, donde se realizó el análisis de vecindario, se cuantificaron y graficaron las etiquetas moleculares relacionadas con el transporte iónico de los vecinos de cada gen. Se evaluó la presencia de las siguientes etiquetas moleculares: transporte iónico (*ion transport*, GO:0006811), transporte de cationes (*cation transport*, GO:0006812), transporte de aniones (*anion transport*, GO:0006820), transporte de hidrógeno (*hydrogen transport*, GO:0006818), procesos metabólicos del fosfato (*phosphate metabolic process*, GO:0006796), transporte de protones (*proton transport*, GO:0015992) y fosforilación oxidativa (*oxidative phosphorylation*, GO:0006119). La descripción de cada etiqueta molecular se muestra en la tabla 9, donde se denota la relación con el objetivo principal de esta investigación, es decir, encontrar genes que puedan inducir tolerancia contra el estrés producido por diversos metales.

Tabla 9: **Descripción de las categorías de Gene Ontology^(*)** empleadas para realizar el histograma que indica muestra la representación de estas etiquetas moleculares en los vecinos directos a los ITRG.

Categorías GO	Descripción de cada categoría
Transporte de iones	El movimiento dirigido de átomos cargados o pequeñas moléculas cargadas hacia dentro, hacia fuera, en la misma célula o entre células, por medio de un agente como un transportador o un poro.
Transporte de cationes	El movimiento dirigido de los cationes, átomos o moléculas pequeñas con una carga neta positiva, cargadas hacia dentro, hacia fuera, en la misma célula o entre células, por medio de algún agente, tal como un transportador o un poro.
Transporte de aniones	El movimiento dirigido de los cationes, átomos o moléculas pequeñas con una carga neta negativa, cargadas hacia dentro, hacia fuera, en la misma célula o entre células, por medio de algún agente, tal como un transportador o un poro.
Transporte de hidrógeno	El movimiento dirigido de hidrógeno (H_2 o H^+), hacia dentro, hacia fuera, en la misma célula o entre células, por medio de algún agente, tal como un transportador o poro.
Procesos metabólicos de fosfato	Las reacciones químicas y vías de participación del grupo fosfato, el anión o una sal de ácido fosfórico.
Transporte de protones	El movimiento dirigido de protones (iones hidrógeno) hacia dentro, hacia fuera, en la misma célula o entre células, por medio de algún agente, tal como un transportador o poro.
Fosforilación oxidativa	La fosforilación del ADP a ATP que acompaña a la oxidación de un metabolito a través del funcionamiento de la cadena respiratoria. La oxidación de los compuestos establece un gradiente de protones a través de la membrana, proporcionando la energía para la síntesis de ATP.

(*): (Gene and Consortium, 2000).

La Figura 7 muestra el histograma construido con las etiquetas moleculares de los vecinos de los ITRG. En ella se observa que los vecinos de los genes 1, 2, 3 y 11 presentan altamente representadas las etiquetas relacionadas con el metabolismo iónico, por lo tanto, según este criterio serían los genes con mejores posibilidades de éxito para el resto de la investigación. Sin embargo sólo se estudiaron los tres primeros genes debido a que poseen un factor común que es el metabolismo energético que puede estar fuertemente ligado con la tolerancia a metales, debido a la producción de ATP, en cambio del ITRG 11, no poseemos mayor información accesoria a la red de co-expresión que nos permitiera contemplarlo como gen prioritario de estudio. Se conoce que la producción de ATP a través de la cadena

transportadora de electrones puede estar ligada con la homeostásis de cationes metálicos (Serrano y Rodriguez-Navarro, 2001; Belyaeva, 2010; Colmer y Greenway, 2011; Mena y col., 2011), por esto decidimos seguir solo con los 3 genes ligados a la producción de ATP.

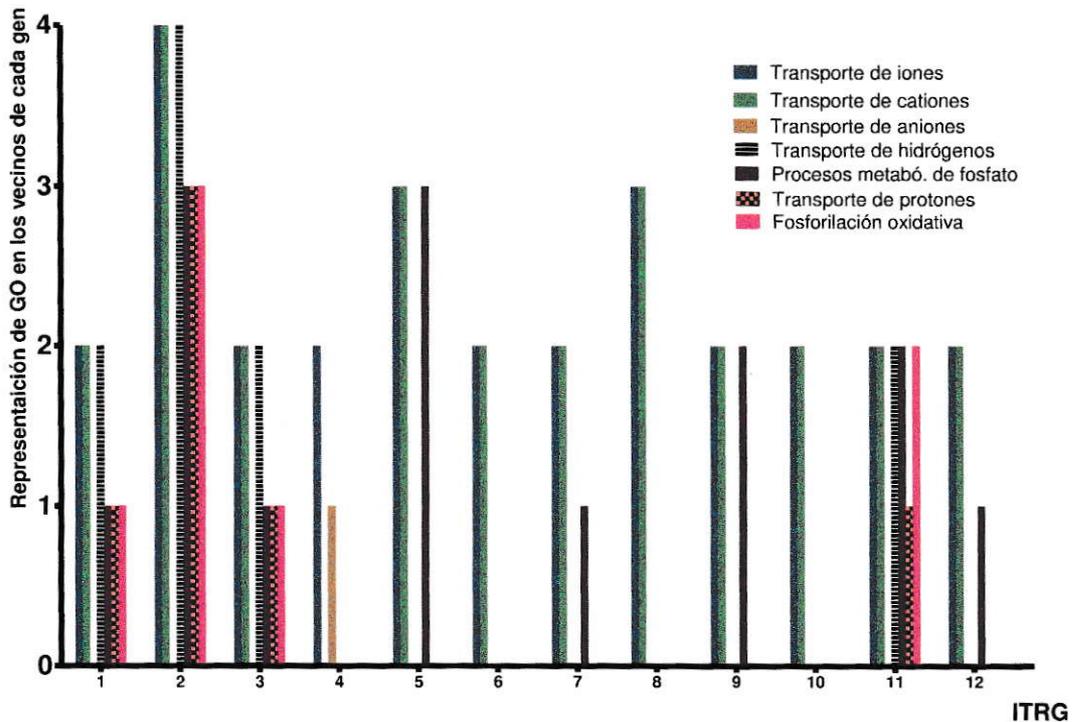


Figura 7: **Histograma que muestra la representación de etiquetas moleculares, ligadas al metabolismo iónico en los vecinos génicos directos a los ITRG, en la red de co-expresión utilizada para todos los genes de *Arabidopsis thaliana*.** En la figura se observa que la mayor agrupación de etiquetas moleculares de interés, se encuentra en los genes 1, 2, 3 y 11. Siendo los vecinos del ITRG 2, aquellos con mayor abundancia en estas etiquetas, registrando 4 incidencias para tres (transporte de iones, transporte de cationes y transporte de hidrógenos) de las 7 etiquetas evaluadas. Por lo tanto, estos genes (ITRG 1, 2, 3 y 11) son excelentes candidatos para estudiar el posible efecto, que cause la proteína codificada por ellos.

3.1.3 Características de ITRG1, ITRG2 y ITRG3

Con el objetivo de concentrar la mayor cantidad de información disponible en las bases de datos sobre los ITRG 1, 2, 3, de acuerdo a lo informado en la base de datos de *Arabidopsis thaliana*, TAIR (www.arabidopsis.org) se encontró que las

regiones codificantes de los genes poseen un tamaño de 723nt (240aa) para el ITRG1, 777nt (258aa) para el ITRG 2, y 510nt (169aa) para el ITRG3.

Con el objetivo de determinar la probable localización subcelular de los productos proteicos de los 3 genes, se realizó una predicción bioinformática de su ubicación con varias herramientas disponibles en línea de libre acceso. Además, se evaluó la posibilidad de encontrar dominios transmembrana evaluando la secuencia proteica de cada uno de los genes. Esos datos entregan argumentos para fortalecer el conocimiento de los genes escogidos, para luego hacer un análisis lo más completo posible. Para ITRG1, en 6 de los 7 programas utilizados se predijo, una ubicación mitocondrial en las células de plantas, además, con las herramientas utilizadas (SVMtm y TMHMM), se descartaría la posibilidad de que la proteína codificada por este gen presente dominios transmembrana (Tabla 10). Para ITRG2, se predice en su mayoría (5 de 7 programas) una localización mitocondrial y 3 programas predijeron que se ubicaría en el citoplasma. Para este gen tampoco se predicen dominios transmembrana (Tabla 11) en el producto proteico. Para el ITRG3, 5 de 7 programas predicen que la ubicación subcelular sería la mitocondria, no encontrándose dominios transmembrana en su secuencia (Tabla 12).

Tabla 10: Predicciones bioinformáticas de la localización subcelular y posibles dominios transmembrana de ITRG1.

Herramienta en línea	Descripción del método	Resultado	Detalles
WoLF-PSORT	Localización subcelular en eucariontes	Mitocondrias Cloroplasto, y Citoplasma	M: 6.0, CP: 5.0, CM: 2.0
SVMtm	Predicción de dominios transmembrana	Sin DTM	-
ESLpred	Predicción mediante alineamientos y propiedades fisicoquímicas	Nuclear	53% de precisión esperada
TMHMM	Predicción de dominios transmembrana	Sin DTM	-
Plant-mPloc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	-
Y-loc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	94.29% de precisión esperada
SubcellProt	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	85% de precisión esperada
EpiLoc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	M: 0.9
SherLoc2	Localización subcelular en eucariontes	Mitocondria	M: 1; CP: 0; M: 0; VC: 0

CP: cloroplasto; CM: citoplasma; VC: vacuola; M: mitocondria. Los datos que entrega el programa WoLF-PSORT provienen del número de secuencias en la base de datos que se asemejan a la secuencia objetivo y que se ubican en el compartimento sub-celular mencionado, los valores de Y-loc se refieren a la probabilidad de encontrar esa proteína en el compartimento sub-celular indicado, los valores de EpiLoc y SherLoc2 hacen referencia a un puntaje arbitrario que entrega el método con una valor máximo de 1 y mínimo de 0. TMHMM y SVMtm predicen si es una proteína intrínseca de membrana y cuantos dominios transmembrana posee.

Tabla 11: **Predicciones bioinformáticas de la localización subcelular y posibles dominios transmembrana de ITRG2.**

Herramienta en línea	Descripción del método	Resultado	Detalles
WoLF-PSORT	Localización subcelular en eucariontes	Cloroplasto, citoplasma y mitocondrias	CP: 9.0, CM: 3, M: 1.0
SVMtm	Predicción de dominios transmembrana	Sin DTM	-
ESLpred	Predicción mediante alineamientos y propiedades fisicoquímicas	Nuclear	53% de precisión esperada
TMHMM	Predicción de dominios transmembrana	Sin DTM	-
Plant-mPloc	Localización subcelular en plantas	Citoplasma, mitocondria	-
Y-loc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	91.79% de precisión esperada
SubcellProt	Localización subcelular en plantas	Citoplasma	25% de precisión esperada
EpiLoc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	M: 0.9
SherLoc2	Localización subcelular en eucariontes	Mitocondria	M: 0.99; CP: 0.01

CP: cloroplasto; CM: citoplasma; M: mitocondria. Los datos que entrega el programa WoLF-PSORT provienen del número de secuencias en la base de datos que se asemejan a la secuencia objetivo y que se ubican en el compartimento sub-celular mencionado, los valores de Y-loc se refieren a la probabilidad de encontrar esa proteína en el compartimento sub-celular indicado, los valores de EpiLoc y SherLoc2 hacen referencia a un puntaje arbitrario que entrega el método con una valor máximo de 1 y mínimo de 0. TMHMM y SVMtm predicen si es una proteína intrínseca de membrana y cuantos dominios transmembrana posee.

Tabla 12: Predicciones bioinformáticas de la localización subcelular y posibles dominios transmembrana de ITRG3.

Herramienta en línea	Descripción del método	Resultado	Detalles
WoLF-PSORT	Localización subcelular en eucariontes	Mitocondrias, Cloroplasto, Citoplasma y Núcleo.	M: 5.5, CP:5.0, CP: 3.5, CM: 2.0, N:2.0
SVMtm	Predicción de dominios transmembrana	Sin DTM	-
ESLpred	Predicción mediante alineamientos y propiedades fisicoquímicas	Nuclear	53% de precisión esperada
TMHMM	Predicción de dominios transmembrana	Sin DTM	-
Plant-mPloc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	-
Y-loc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	97.34% de precisión esperada
SubcellProt	Localización subcelular en plantas	Citoplasma	25% de precisión esperada
EpiLoc	Localización subcelular en plantas	Mitocondria	M: 0.9
SherLoc2	Localización subcelular en eucariontes	Mitocondria	M: 1; CP: 0; CM: 0;

CP: cloroplasto; CM: citoplasma; VC: vacuola; M: mitocondria; N: núcleo. Los datos que entrega el programa WoLF-PSORT provienen del número de secuencias en la base de datos que se asemejan a la secuencia objetivo y que se ubican en el compartimento sub-celular mencionado, los valores de Y-loc se refieren a la probabilidad de encontrar esa proteína en el compartimento sub-celular indicado, los valores de EpiLoc y SherLoc2 hacen referencia a un puntaje arbitrario que entrega el método con una valor máximo de 1 y mínimo de 0. TMHMM y SVMtm predicen si es una proteína intrínseca de membrana y cuantos dominios transmembrana posee.

3.1.4 Análisis de los perfiles de expresión de plantas sometidas a estrés salino y estrés osmótico.

Para determinar el perfil de expresión de los ITRG y en especial de los tresgenes seleccionados con mayor probabilidad de estar involucrados en el transporte iónico, se analizaron los datos de microarreglos disponibles en la base de datos NASC (Craigon y cols., 2004), correspondientes a experimentos de plantas sometidas a estrés salino con NaCl 150mM y estrés osmótico utilizando Manitol 300mM. No existen datos de microarreglos donde se hayan hecho tratamientos con otros iones que nos pudieran entregar mayores datos relacionados con el transporte iónico, estos son los datos con mayor relación disponibles. Lo ideal habría sido analizar la acumulación de mRNA en microarreglos de plantas sometidas a estrés por una mayor diversidad de metales, además del sodio, sin embargo no existen estudios de este tipo utilizables de manera libre para la comunidad científica. Los datos empleados corresponden a los experimentos publicados como AtGenExpress Stress Treatments (Control plants), AtGenExpress Stress Treatments (Salt stress), AtGenExpress Stress Treatments (Osmotic stress). Estos experimentos son parte del proyecto multinacional liderado por la German Arabidopsis Functional Genomics Network (AFGN) (Kilian et al., 2007). Los tres grupos de experimentos corresponden a 84 chips ATH1 AffymetrixTM donde se incluyen distintos tiempos de exposición a los distintos tratamientos (control, estrés osmótico y estrés salino), dos tipos de tejido (parte aérea y raíz) y una réplica técnica en cada caso. Para poder realizar el análisis de los datos, lo primero que se verificó fue la calidad de los microarreglos para que fueran comparables entre sí. Los resultados de la normalización realizada por RMA (Irizarry, 2003), se muestran en la Figura 8.

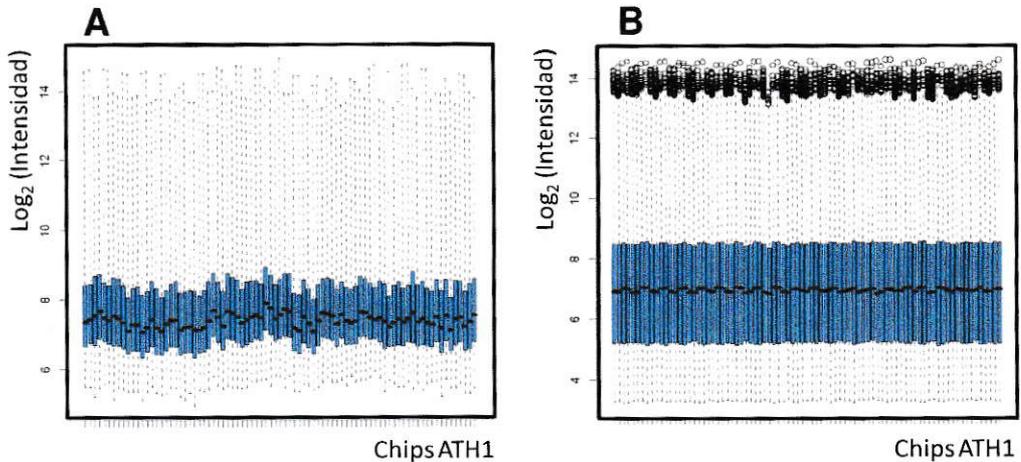


Figura 8: **Normalización de los datos de microarreglos realizados a plantas de *Arabidopsis thaliana* en situación control, estrés osmótico y estrés salino.** Los gráficos de cajas representan la diferencia de intensidad de los datos de los 84 microarreglos ATH1 Affymetrix, correspondientes a los datos crudos de las distintas condiciones experimentales analizadas: controles, estrés osmótico y estrés salino (A) en distintos tiempos y los datos normalizados (B) usando RMA (Irizarry, 2003). Estos son gráficos de cajas, donde la línea negra central simboliza la media geométrica de cada distribución de datos, en azul se muestra la distribución del 50% de los datos y los restantes datos se grafican con las líneas discontinuas en la parte inferior y superior de cada barra azul. Se observa una media geométrica similar en el gráfico normalizado, a diferencia de una dispar en el no normalizado, lo que indica que todos los datos son comparables entre ellos luego de ser tratados con RMA.

Una vez que los chips fueron normalizados, se compararon los datos de los diferentes estreses con los respectivos controles. Se tiene el promedio de dos datos por cada tiempo (réplicas técnicas), los tiempos empleados son 0; 0,5; 1; 3; 6; 12 y 24 h de exposición a la condición correspondiente. En la figura 9 se muestran por separado los datos correspondientes a la parte aérea y a la raíz, donde se grafican las razones de los valores correspondientes a cada tiempo en los estreses evaluados, versus su control. En la figura se puede observar que ninguno de los ITRG alcanza a cambiar su expresión dos veces con respecto al control (valor 2), lo que sugiere que estos genes frente a las condiciones evaluadas puntualmente, no muestran una expresión o represión. Esto debido a que, en general se acepta una variación efectiva en la expresión, cuando al menos se dobla el valor control. Se

ven pocos cambios en la expresión general de los ITRG, sin embargo, estos cambios no son los esperados, por ejemplo el ITRG 9 aumenta su expresión en estrés salino y estrés osmótico al mismo tiempo en las muestras de parte aérea (figura 3 A y B). Los genes de interés son aquellos que aumentan su expresión frente a un estrés y disminuyen frente a otro o se mantienen sin cambio frente a un estrés y reaccionan frente a otro.

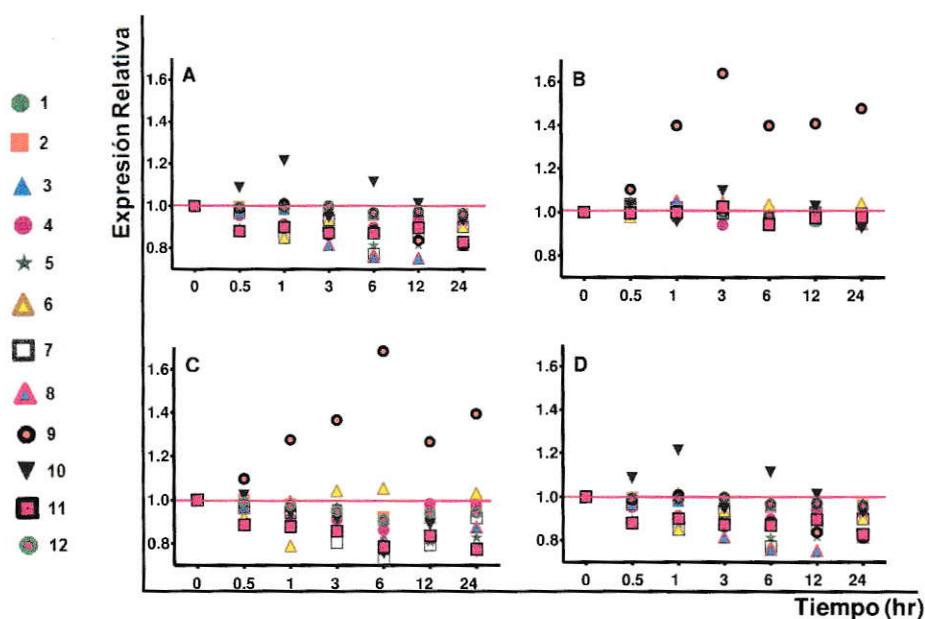


Figura 9: **Perfiles de expresión de los ITRG correspondientes a datos de microarreglos de estrés salino y osmótico.** Se muestra la expresión relativa de los 12 genes correspondientes a plantas *Arabidopsis thaliana* silvestres tratadas con estrés salino y osmótico. En A y B se muestran los perfiles de expresión obtenidos desde muestras de la parte aérea, A corresponde a estrés salino (NaCl 150 mM) y B a estrés osmótico (Manitol 300 mM). C y D corresponden a los datos de la raíz, C muestra estrés salino y D estrés osmótico. Los valores indicados se obtuvieron haciendo la razón entre la expresión registrada en cada estrés dividida por el valor presentado en los tratamientos controles. La línea roja presente en cada gráfico hace notar el valor de 1, el cual corresponde a una expresión similar en los tratamientos y los controles. Estos datos provienen de promedios de dos réplicas experimentales. Todos los datos fueron obtenidos desde la Base de datos NASC (Craigon y cols., 2004).

En la Figura 10 se muestran los patrones de expresión de los tres ITRG estudiados en esta investigación. Se puede ver que los genes siguen un mismo patrón de expresión en las dos condiciones de estrés analizadas, tanto en la raíz como en la parte aérea. Aun así, el patrón de cambio en el tiempo presenta valores bajos para ser consideradas como variaciones significativas y obtener conclusiones al respecto del comportamiento del gen, por lo tanto en términos generales, se consideró que no hubo un cambio de expresión en el tiempo, en las condiciones experimentales utilizadas en los experimentos públicos.

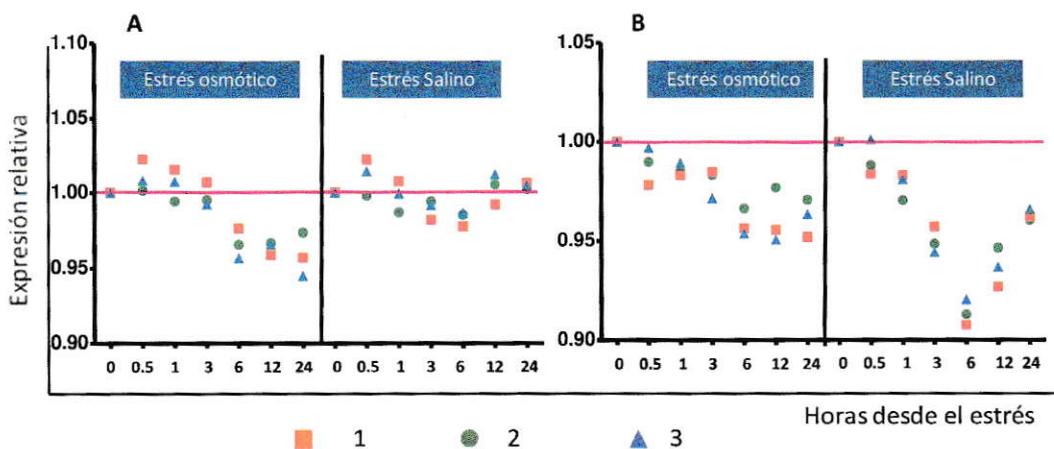


Figura 10: **Perfiles de expresión de los ITRG seleccionados en este estudio.** Se muestra la expresión relativa de los tres genes correspondientes en tratamientos de estrés salino (NaCl 150 mM) y osmótico (Manitol 300 mM) realizados a plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres. A la izquierda (A) se muestran los perfiles de expresión obtenidos desde muestras de la parte aérea correspondientes a estrés salino y estrés osmótico. En la derecha (B) se muestran los datos de estrés salino y estrés osmótico de la raíz. Los valores indicados corresponden a la razón entre los niveles de transcrito en el tratamiento analizado y la condición control. La línea roja presente en cada gráfico indica el valor de 1, en que no hay cambios en los niveles de transcrito en ambas condiciones. Los datos utilizados corresponden al promedio de dos réplicas experimentales. Todos los datos fueron obtenidos desde la Base de datos NASC (Craigon et al., 2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos, por el análisis de los perfiles de expresión de los ITRG y en particular de los 3 genes seleccionados, se encontró que no varían su expresión de manera sustancial. De esta forma, estos datos de microarreglos no entregan una información interesante para ser utilizada como método de valoración entre los distintos ITRG, sin embargo son interesantes desde el punto de vista de la caracterización y descripción de los genes investigados.

3.2 Generación de *S. cerevisiae* transformadas con los genes de *A. thaliana* con alta probabilidad de estar implicados en el transporte iónico (ITRG).

Una vez que se seleccionaron los genes que poseen una alta probabilidad de estar implicados en el transporte iónico (ITRG), se empleó como estrategia para determinar su posible potencial en la modificación de la tolerancia al estrés salino, el uso de un modelo heterólogo a las plantas, como lo son las levaduras. Específicamente las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Esta es una estrategia contundente para analizar el fenotipo que puede inducir una transformación génica. Para obtener levaduras que expresen los genes seleccionados, se debe realizar las construcciones moleculares adecuadas. Es decir, aislar las secuencias que codifiquen para los genes de interés, luego clonar estas secuencias y determinar si se encuentran íntegras en el clon. Se deben efectuar las debidas las verificaciones moleculares, para estar seguros de los fragmentos clonados y de la futura correcta expresión del producto génico. Posterior a clonar los marcos de lectura abierto en vectores de clonamiento, mediante recombinación, se realiza el subclonamiento en los vectores de expresión, con los cuales se transformaron las levaduras.

3.2.1 Obtención de las secuencias de *A. thaliana* correspondientes a los ITRG 1, 2 y 3 y clonamiento en vectores para posteriores análisis funcionales.

3.2.1.1 Extracción y procesamiento de RNA de plantas silvestres de *A. thaliana*

Para obtener un RNA molde desde el cual amplificar las secuencias de interés se extrajo RNA desde plántulas silvestres de diez días de *Arabidopsis thaliana* Col-0 (Figura 11). Posteriormente, se realizó transcripción reversa utilizando el RNA extraído y un oligo que permite la retro-transcripción de todos los mRNA mensajeros disponibles en el extracto de RNA, el partidador, oligo AP (ver sección 2.2.2.2 de materiales y métodos). En la Figura 11, se muestra la calidad del RNA empleado para hacer la transcripción reversa, mostrándose en la figura bandas definidas, lo que garantiza la integridad del RNA extraído, validando el método de extracción y asegurando que se tiene un material de amplificación inicial en óptimas condiciones.

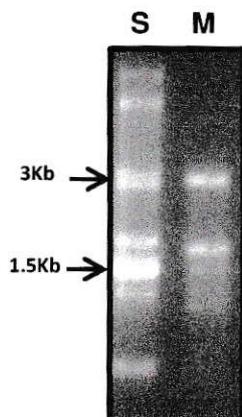


Figura 11: **Electroforesis de RNA en condiciones denaturantes.** En esta imagen muestra la integridad del RNA aislado de plántulas de *Arabidopsis* (M). S: estándar de peso molecular de RNA.

3.2.1.2 Amplificación de los ITRG de *A. thaliana*.

Utilizando las secuencias correspondientes de los ITRG 1, 2 y 3 disponibles en la base de datos de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org) se diseñaron los partidores de

manera de amplificar la secuencia de cDNA correspondiente a los ITRG (sección 2.2.2.3 de materiales y métodos). Mediante PCR se verificó que estos partidores amplifican una banda única del tamaño esperado para cada uno de los 3 genes de interés, a partir del cDNA de plántulas de Arabidopsis (Figura 12).

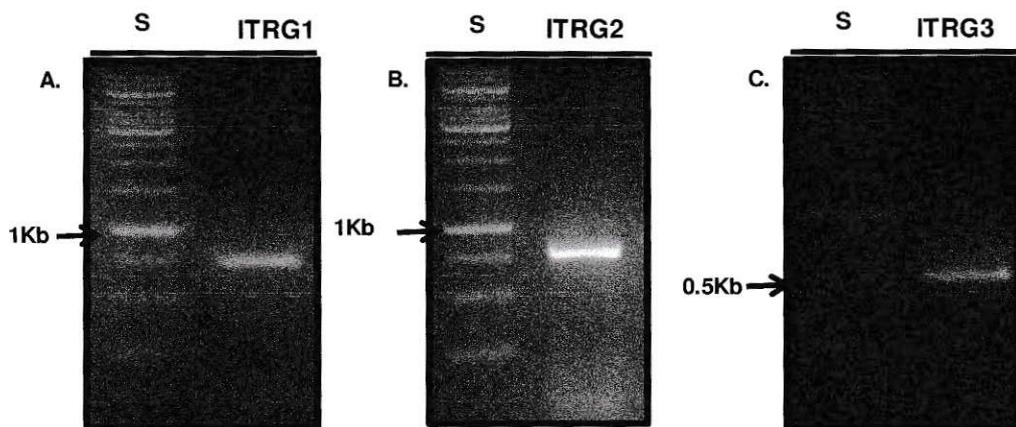


Figura 12: **Electroforesis de los fragmentos amplificados, correspondientes a los marcos de lectura abierto de ITRG 1, 2 y 3.** En la figura se muestran los productos de amplificación de PCR empleando los pares de partidores diseñados para cada gen. Se obtuvieron bandas del tamaño esperado para los tres ITRG. Se muestra la banda amplificada con los partidores diseñados para el ITRG1 (A, tamaño esperado: 723 pb), ITRG2 (B, tamaño esperado: 786 pb), ITRG3 (C, tamaño esperado: 510 pb). S: estándar de peso molecular.

3.2.2 Clonación de los marcos de lectura abierto de ITRG 1, 2 y 3 en el vector pCR8.

Para realizar este proceso se utilizó la tecnología GATEWAY de INVITROGEN, la que se basa en clonar los fragmentos de interés en un vector de entrada genérico para posteriormente subclonar este fragmento en vectores de expresión correspondientes al modelo biológico de interés. En esta investigación se utilizó el kit pCR8/GW/TOPO TA cloning, cuyo vector se emplea en adelante como pCR8. Este vector es entregado por el proveedor de forma lineal, posee adheridas a

las secuencias de sus extremos (attR1 y attR2, claves para la recombinación futura), enzimas topoisomerasa, las cuales realizan la reacción de ligación de los fragmentos. Una vez clonados los ITRG en el vector, se secuencian los insertos y se verifica la correcta formulación de las construcciones de interés, es decir su posición con respecto al promotor, verificación de posibles mutaciones y presencia o ausencia del codón de término según sea el objetivo. Posteriormente esta construcción se utiliza para realizar la recombinación homologa en sentido con algún vector de destinación de interés. Lo cual permite gran plasticidad para utilizar distintos vectores, con diferentes tipos de promotores (inducibles o constitutivos), diferentes etiquetas para marcar las proteínas codificadas por los genes clonados, en el extremo amino o carboxilo terminal de las mismas, etc.

3.2.2.1 Ligación y clonación de los ITRG en el vector pCR8.

Utilizando la tecnología GATEWAY, las secuencias correspondientes a los marcos de lectura abiertos de los ITRG se ligaron en el vector de entrada pCR8. De esta manera se obtienen las construcciones pCR8-ITRG1, pCR8-ITRG2 y pCR8-ITRG3. Para comprobar que se ligaron correctamente los genes ITRG en el vector de entrada, es decir que se encuentren en sentido con respecto al promotor, se realiza una digestión con endonucleasas y se compara el patrón esperado en base a las secuencias disponibles en las base de datos (www.arabidopsis.com). En la Figura 13 se muestran las imágenes de las electroforesis, donde se separaron los fragmentos producidos al realizar las digestiones, empleando diferentes endonucleasas para cada una de las construcciones realizadas con los ITRG 1, 2 y 3 en pCR8.

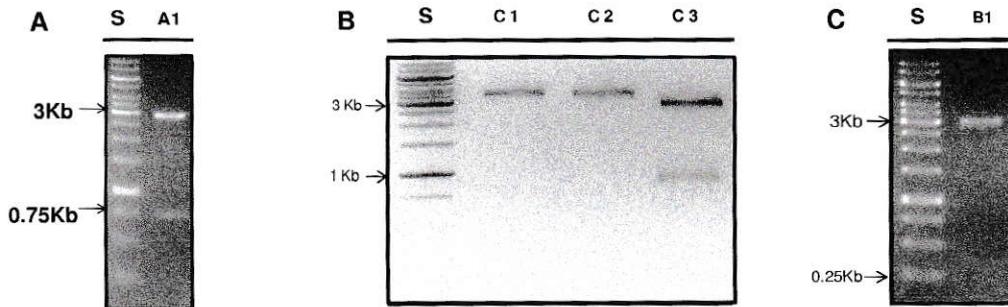


Figura 13: **Electroforesis de los fragmentos de DNA productos de las digestiones enzimáticas realizadas a las construcciones efectuadas con pCR8 y los ITRG 1, 2 y 3.** Comprobación de construcciones de entrada. Se muestran las electroforesis donde se evaluaron las digestiones enzimáticas efectuadas a las construcciones realizadas con pCR8 y los ITRG 1, 2 y 3 con el fin de determinar el correcto sentido de los genes clonados. (A) Digestión realizada con la enzima EcoRV de la construcción pCR8-ITRG1 (3574 pb), observándose bandas de menos de 3000 y casi de 700 pb (bandas esperadas: 2851 y 690 pb). (B) Digestión efectuada con la enzima BamH1 y EcoRV de la construcción pCR8-ITRG2 (3602 pb), donde se observan bandas aproximadamente menores de 1000 y 3000 pb en la columna C3, C1 y C2 corresponden a clones en sentido contrario al clon C3 (se esperaban bandas de 2739 y 863 pb, por lo tanto el fragmento en C3 se encontraría en sentido respecto a los sitios attR1 y attR2, trabajando con este clon en los experimentos posteriores) (C) Digestión realizada con la enzima EcoRV de la construcción pCR8-ITRG3 (3329 pb) donde se perciben bandas de próximas a 3000 y 300 pb (bandas esperadas: 3010 pb y 319 pb). S: Estándar de peso molecular. A1: muestra que contenía el resultado de la digestión realizada a la construcción pCR8-ITRG1; C1, C2 y C3: distintas muestras que contenían el resultado de digestiones realizadas a posibles construcción pCR8-ITRG2 (seleccionando C3); B1: muestra que contenía el resultado de la digestión realizada a la construcción pCR8-ITRG3.

La construcción pCR8-ITRG1 tiene un tamaño de 3574 pb, para comprobar la orientación de la secuencia clonada, con respecto a los sitios attR1 y attR2 del vector pCR8, se hizo una digestión con la enzima EcoRV. Si el fragmento se encontraba en sentido con respecto a los sitios de recombinación, se deberían obtener fragmentos de 2851pb y 690 pb. Mientras que si se encontraba en sentido contrario se tendrían bandas de 3289 pb y 285 pb. Como se ve en la Figura 13A, se obtuvo el patrón de bandas que señalaba que el fragmento se encontraba en sentido con respecto a los sitios de recombinación (A1).

Al ligar pCR8 con el fragmento ITRG2 se obtuvo una construcción que corresponde a un tamaño de 3602 pb. Para determinar la orientación de la secuencia ligada con

respecto a los sitios de recombinación del vector, se hizo una digestión con las enzimas BamH1 y EcoRV. Si el fragmento se encontraba en sentido se deberían obtener fragmentos de 2739 pb y 863 pb, mientras que si se encontraba en sentido contrario se tendrían bandas de 3404 pb y 1170 pb. Se comprobó la orientación sentido, tal como se muestra en la Figura 13B. En esta figura se muestran 3 clones, donde C3 es el clon que muestra estar en sentido, no así C1 y C2.

El tamaño de la construcción pCR8-ITRG3 es 3574 pb. Para comprobar la orientación de la secuencia ligada con respecto al promotor del vector, se realizó una digestión con las enzimas BamH1 y EcoRV. Si el fragmento se encontraba en sentido se deberían obtener fragmentos de 3010 y 319 pb, mientras que si se encontraba en sentido contrario se obtendría sólo una banda de 3329 pb. En la Figura 13C se observa el patrón de bandas correspondiente al gen ITRG3 en sentido con respecto a los sitios attR1 y attR2 de pCR8.

3.2.2.2 Secuenciación de las construcciones pCR8-ITRG1, pCR8-ITRG2 y pCR8-ITRG3

Para determinar si las secuencias de los ITRG clonadas en el vector pCR8, que poseían la orientación sentido con respecto a los sitios de recombinación (verificado por digestión enzimática) se encontraban en buenas condiciones, se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen. La secuenciación se realizó con los partidores universales M13, cuyas secuencias forman parte del plasmidio pCR8. Por lo tanto, permiten secuenciar íntegramente los fragmentos clonados. Para las 3 construcciones se obtuvieron fragmentos clonados con un 100% de identidad con respecto a las secuencias disponibles en la base de datos www.arabidopsis.org.

fusión con EGFP respectivamente. Con estos dos tipos de vectores, podemos evaluar el posible efecto diferencial de un epítipo pequeño (1,2 kDa) como HA, frente a una proteína de fusión con una proteína medianamente grande, como lo es la proteína fluorescente verde, EGFP. Las digestiones obtenidas de las construcciones obtenidas con los tres plasmidios antes mencionados se muestran de manera resumida en la tabla 13. Con estas digestiones se comprobaron las orientaciones de los insertos en las distintas construcciones, siguiendo adelante con las construcciones que efectivamente presentaban una correcta orientación respecto a cada promotor

Tabla13: Endonucleasas utilizadas para verificar las construcciones con los vectores de expresión en levaduras. Se informan las endonucleasas utilizadas para realizar las digestiones enzimáticas simples o dobles, con el objetivo de verificar el correcto sentido de los insertos en cada construcción. Además se indican los distintos tamaños* de fragmentos de DNA obtenidos, al realizar las digestiones enzimáticas. S: se refiere al correcto sentido del marco lectura del gen con respecto al promotor. AS: se refiere a que el marco de lectura está en sentido contrario al promotor.

pYES-DEST52			
	ITRG1	ITRG2	ITRG3
Enzimas	<i>EcoRV- EcoR1</i>	<i>EcoR1</i>	<i>Kpn1-Pst1</i>
S	2980- 2970 505-187-67	5950- 538-263	3548-2442-488
AS	3739 – 2970	6169- 582	5976 - 488
pAG426GPD-ccdB-HA			
	ITRG1	ITRG2	ITRG3
Enzimas	<i>Xho1-Sac1</i>	<i>Sac1-BamH1</i>	<i>Xho1-Xba1</i>
S	5886-993-783	5931-674-544+424-95-36	3854- 2694- 418- 348
AS	5886-1326-450	5931-1099-674	3854- 2694- 767
pAG426GPD-ccdB-GFP			
	ITRG1	ITRG2	ITRG3
Enzimas	<i>Xba1</i>	<i>Sac 1</i>	<i>Xho1-Xba1</i>
S	3854- 3640- 776	6951- 1195- 36	3854- 2694- 1591
AS	3854- 3530- 527- 359	8182	3854- 2694-1074-512

* Se utilizó electroforesis en geles de agarosa para determinar los tamaños de los fragmentos de cada digestión, lo que sólo permite una aproximación al fragmento esperado.

Además, para posible estudios futuros, se efectuaron recombinaciones con los ITRG 1, 2 y 3 y el vector de expresión en plantas pGWB8. Pudiéndose llevar a cabo estudios de sobreexpresión, permitiendo el estudio en Arabidopsis u otras plantas que sea posible transformar con el vector mencionado.

3.2.3 Transformación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* BY 4743 con construcciones realizadas con las distintas transformaciones realizadas.

Para evaluar el efecto que podría causar la expresión de los genes ITRG en la tolerancia a distintos cationes en levaduras, se transformaron levaduras *Sacharomices cerevisiae*, cepaBY4743 con las diferentes construcciones realizadas con los ITRG.

3.2.3.1 Confirmación de las levaduras transformadas con las construcciones realizadas con los ITRG **Gen los vectores pYES-DEST52, pAG426GPD-ccdB-HA y pAG426GPD-ccdB-GFP.**

Para confirmar que las levaduras obtenidas de la transformación fueran efectivamente transformantes, en un primer paso, el que logre crecer en un ambiente auxótrofo indica que se han transformado con el vector que le permiten a la levadura sintetizar uracilo, luego se realizó un PCR de colonias (no mostrado). Donde de una manera rápida se evidencia que las levaduras sean transformantes. Se obtuvieron los transformantes de interés, entre los pCR8-ITRG y los distintos vectores de destinación, sin embargo, el clon de levadura transformado con pAG426GPD-ITGR2-HA no se logró conseguir.

3.2.3.2 Análisis de la acumulación de proteínas ITRG en levaduras mediante Western blot

Una vez que se obtuvieron las levaduras transformantes, se procedió a estudiar su acumulación al realizarse una correcta expresión de los genes ITRG en las distintas construcciones, lo que nos indicaría si la proteína se produce en las levaduras transformadas. Lo primero que se realizó fueron experimentos de western blot, esto además nos entregara información del tamaño de las proteínas producidas en las

transformantes. En la tabla 14 se informan los valores de las bandas esperadas para cada proteína de fusión, tomando en cuenta que los genes clonados, ITRG1, ITRG2 y ITRG3 codifican para proteínas de 27.5 kDa, 29kDa y 19kDa respectivamente. Para los experimentos de expresión se contó con dos controles negativos, uno es una construcción efectuada con el ITRG3 en sentido inverso con respecto al promotor de la construcción (ITRG3 AS). Mientras el otro control negativo corresponde a los vectores de interés sin ningún gen inserto, a las que se les llamó SI. Es decir los vectores desde los que se realizaron las construcciones, pero conservando las secuencias que normalmente se eliminan al realizarse la recombinación, como es la secuencia *ccdb*. En la Figura 14 se muestra un western blot con proteínas extraídas de levaduras transformadas con las construcciones realizadas con el vector pYES-DEST52. Se evidencia la presencia de proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-V5 para los genes ITRG2 (carril 1) e ITRG3 (carril 3). Correspondiendo aproximadamente el tamaño moleculares esperado para la construcción pYES-ITRG2. Mientras que para la fusión realizada con el ITRG 3 se observa una banda de mayor tamaño del esperado, de alrededor de 30kDa. Estos resultados muestran que estas dos proteínas se están expresando, con mayor grado de seguridad en el primer caso, debido a que en el carril 1, se muestra una banda que concuerda con el peso molecular calculado para la proteína traducida a partir de la construcción pYES-ITRG2. Para pYES-ITRG1 no se observa acumulación de proteínas por este método. Esto podría explicarse por algún problema relacionado con la disponibilidad o presencia del epítipo.

Tabla 14: **Masas molares esperados de las proteínas codificadas en las distintas construcciones.** En la tabla se informan las masas molares de las proteínas de fusión esperadas. El epítopo V5-HIS tiene un tamaño de aproximadamente 4kDa, el epítopo HA 1,2 kDa y la proteína EGFP 26kDa.

	Proteínas nativas	pYES-DEST52	pAG426GPD-ccdB-HA	pAG426GPD-ccdB-GFP
ITRG 1	26kDa	31.5 kDa	29kDa	53kDa
ITRG 2	29kDa	33kDa		55kDa
ITRG 3	19kDa	23kDa	20kDa	45kDa



Figura 14: **Detección de las proteínas ITRG1, ITRG2 e ITRG3 mediante Western blot en extractos proteicos de levaduras transformadas con las construcciones correspondientes.** Las muestras utilizadas corresponden a extractos proteicos de levaduras transformadas con las construcciones realizadas con pYES y ITRG2, ITRG1, ITRG3, ITRG3 AS, y SI respectivamente. Se observa una banda de masa molar superior a 30kDa para pYES-ITRG2 y una banda de un tamaño levemente menor para la construcción pYES-ITRG3. Se empleó el estándar de peso molecular no teñido de fermentas, algunas de sus bandas están señaladas a la izquierda de la imagen. Se empleó el anticuerpo primario α V5.

3.2.3.3 Análisis de la acumulación de proteínas de fusión ITRG1, 2 y 3 con EGFP en levaduras transformadas con las construcciones pAG426GPD-ITRG-GFP

Para evidenciar el correcto proceso de expresión génica y posterior acumulación de proteínas en las levaduras transformantes, se realizaron construcciones con un vector que permite la fusión de los ITRG con la proteína fluorescente verde aumentada (EGFP). Junto con lo anterior, esta técnica permite determinar la localización subcelular de las proteínas de fusión. Las levaduras transformadas observaron mediante microscopía confocal. Los resultados se exponen en la Figura 15, donde se observa la señal de fluorescencia en las levaduras transformadas con las construcciones que poseen los genes ITRG1, ITRG2, ITRG3. En los controles negativos, levaduras transformadas con ITRG3 AS y las levaduras transformadas con el vector SI, no se detecta fluorescencia. Para las transformaciones realizadas con la construcción que posee el ITRG 1, 2 y 3 se aprecia fluorescencia. Confirmando la acumulación de las proteínas de fusión codificadas por los 3 ITRG seleccionados fusionados a EGFP en el extremo carboxilo terminal. Para los tres casos (construcciones con ITRG1, ITRG2 e ITRG3 en sentido) se observa fluorescencia en el citoplasma.

Además, para la construcción realizada con el ORF ITRG2, se ve cierta acumulación en la membrana que puede deberse a la imagen registrada.

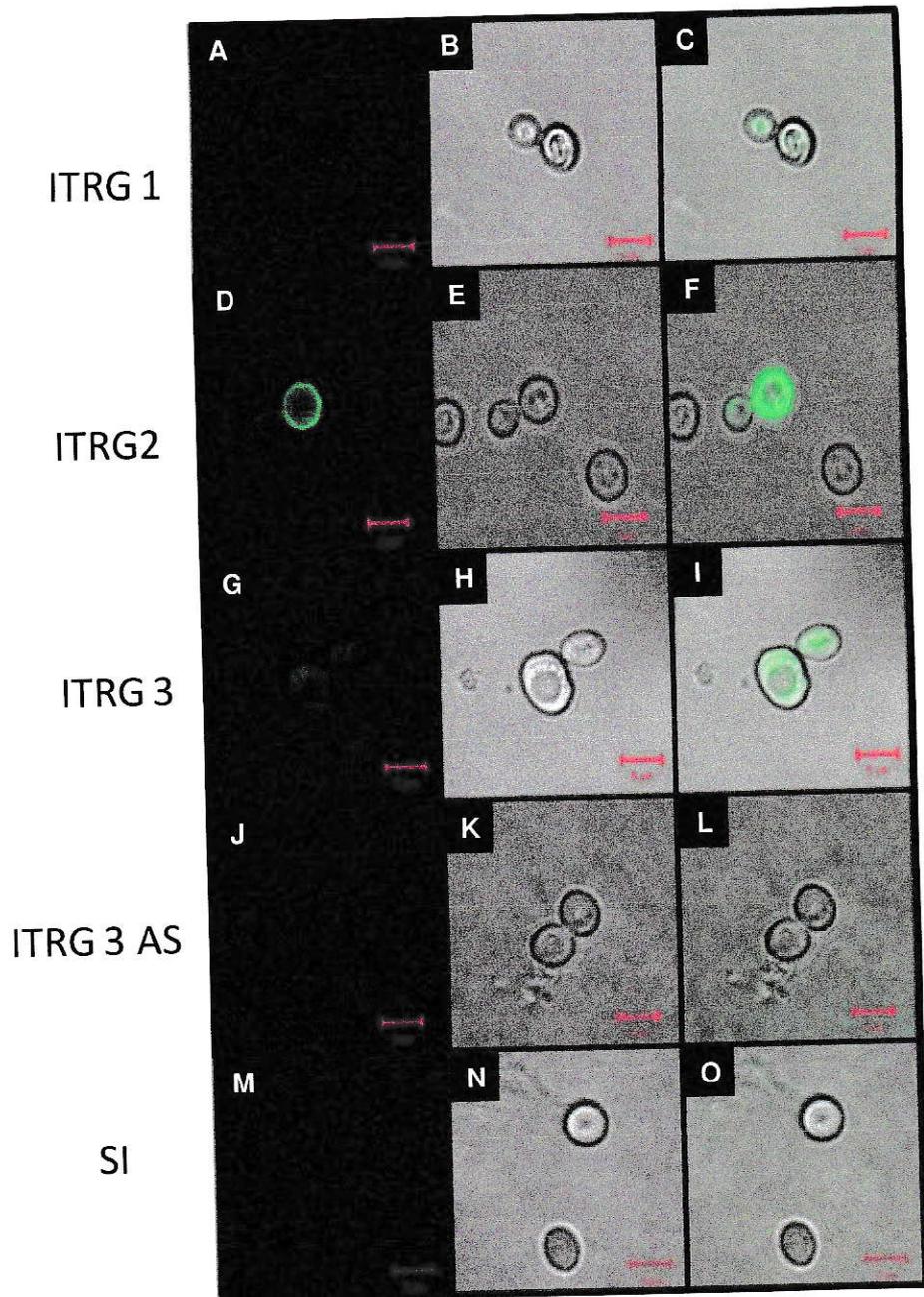


Figura 15: Las proteínas de fusión ITRG 1, ITRG 2 e ITRG 3 con EGFP se acumulan en las levaduras transformantes. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de levaduras transformadas con las construcciones realizadas con el vector pAG426GPD-ccdB-GFP y los genes seleccionados ITRG1, ITRG2, ITRG3, ITRG 3 AS. Además del vector sin inserto (SI). En A, D, G, J, M se muestran las imágenes correspondientes a EGFP. B, E, H, K, N corresponden a las imágenes de campo claro. En C, F, I, L, O se indica la superposición de la imagen de EGFP y campo claro.

En la figura 15 A, D y G se observa la fluorescencia de EGFP en las levaduras transformadas con los ITRG. Para las levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG1-GFP y pAG426GPD-ITRG3-GFP se observa una localización uniforme en toda la célula, la cual se asociaría al citoplasma, en tanto las levaduras transformadas por pAG426GPD-ITRG2-GFP, se percibe una localización cercana a los bordes celulares, por lo tanto podría tratarse de la membrana celular.

3.3 Evaluación de la tolerancia a condiciones salinas estresantes en *S. cerevisiae* transformada con las construcciones que poseen ITRG 1, ITRG 2 y ITRG 3.

Para evaluar el comportamiento de las diferentes levaduras transformadas frente al tratamiento con distintos cationes metálicos, se realizaron ensayos de tolerancia. Estos ensayos se efectuaron en cultivos líquidos de levaduras crecidas en distintas concentraciones de cationes metálicos. En estos experimentos se evaluó el crecimiento de las levaduras, midiendo la densidad óptica de los cultivos a través del tiempo. De esta manera se evaluó la capacidad de crecimiento de las levaduras sometidas a estrés salino, entendiéndose este como estrés a distintas sales como NaCl, CuSO₂, ZnCl₂, etc.

Se estudió el efecto en el crecimiento de las levaduras al ser incubadas con los cationes metálicos; sodio (Na⁺), zinc (Zn²⁺), cobre (Cu²⁺), cadmio (Cd²⁺) y cobalto (Co²⁺). Cada experimento se efectuó al menos por duplicado, donde en cada oportunidad se hicieron triplicados técnicos de los tratamientos. Los valores informados fueron relativizados a la población de levaduras del tiempo inicial. Es decir, corresponden a la razón entre el promedio de la medición en un tiempo dado y el promedio registrado al inicio del experimento (tiempo cero). Los valores en cada punto se informan con su respectivo error estándar. Los experimentos de

tolerancia se realizaron con levaduras transformadas con los tres tipos de construcciones realizadas, es decir, las construcciones efectuadas para los ITRG 1, 2 y 3 (además de los controles respectivos), empleando los vectores pYES-DEST52, pAG426GPD-ccdB-HA y pAG426GPD-ccdB-GFP.

3.3.1 Evaluación de la tolerancia a cationes metálicos presentadas por *S. cerevisiae* que expresan los ITRG 1, 2 y 3 bajo el control del promotor inducible por galactosa.

Se evaluó el crecimiento de las levaduras transformadas con las construcciones realizadas con el vector que posee un promotor inducible por galactosa, pYES-DEST52. Para ello, las levaduras transformadas con estas construcciones, fueron previamente crecidas en un medio que contiene rafinosa para permitir una inducción más rápida y eficiente del promotor, al agregar la galactosa. Luego de 6 h de la inducción con galactosa, se registró y monitoreó el crecimiento de los cultivos de levadura en presencia de los distintos cationes metálicos. En la Figura 16 se muestran las curvas de crecimiento, correspondientes a las levaduras transformadas con la construcción pYES-ITRG 1.

En los gráficos de la Figura 16 se muestra que los cultivos de levaduras transformadas con la construcción pYES-ITRG 1, presentan tolerancia notablemente mayor que las levaduras control (transformadas con el vector vacío) en los medios que poseen Na^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} , en las 3 concentraciones evaluadas, para cada uno de ellos. En tanto, para el Cu^{2+} se ve una mayor tolerancia de las levaduras transformadas con la construcción pYES-ITRG 1 en la concentración de 1 mM. Para el Zn^{2+} (Figura 16B) se observa un comportamiento similar de las levaduras sometidas a las 2 concentraciones más bajas, sin embargo en la concentración de 10 mM (la más alta evaluada) de Zn^{2+} existe un menor grado

de tolerancia, pero, de todas formas es mayor que su respectivo control. En los tratamientos con cobre se puede observar que en la concentración más baja, las levaduras logran crecer más que las controles, pero con una leve diferencia.

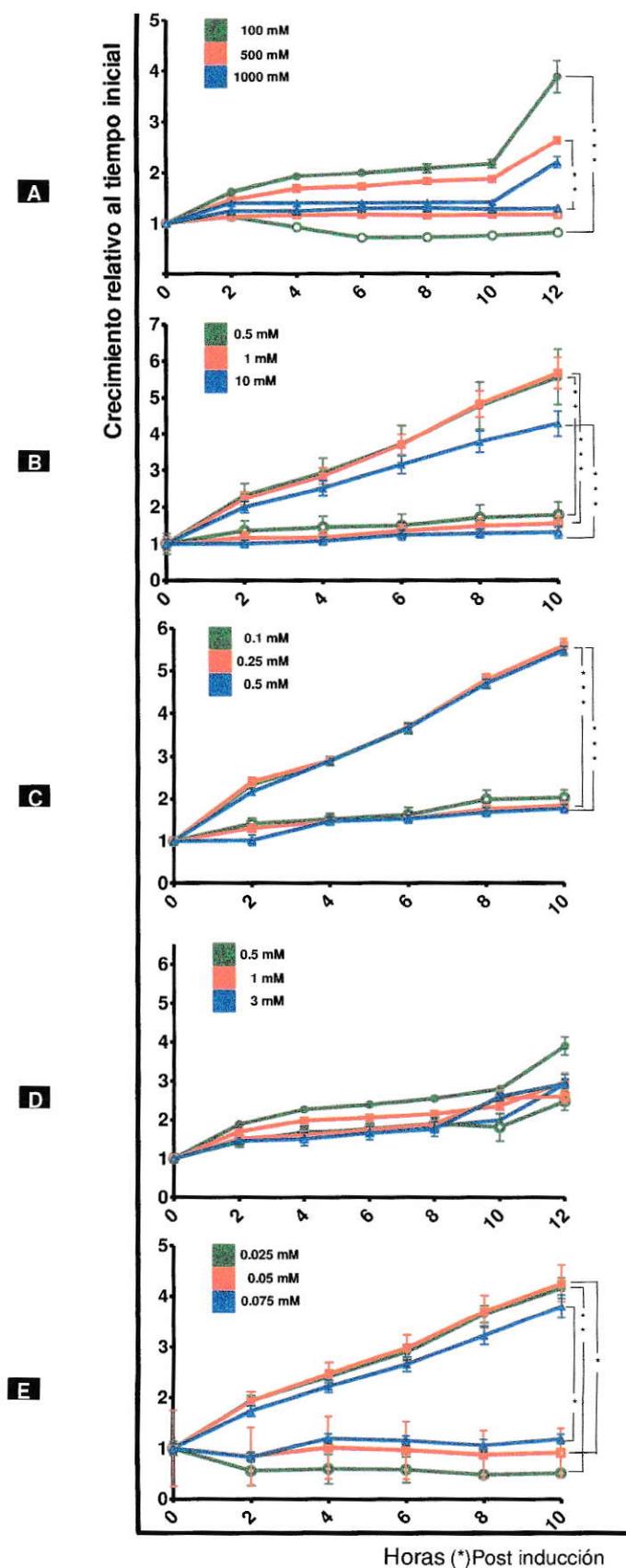


Figura 16: **Tolerancia de levaduras transformadas con la construcción pYES- ITRG 1.**

Se muestra la tolerancia de levaduras transformantes en presencia de NaCl (A), ZnCl₂ (B), CoCl₂(C), CuSO₂ (D) y CdCl₂(E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada sal metálica, indicadas en la figura. En las gráficas se informa el crecimiento relativizado al tiempo inicial.  ,  y  corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pYES- ITRG 1.  ,  y  corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las cuales fueron incubadas los cultivos de levaduras transformadas con el vector sin inserto. Los experimentos se realizaron luego de 6 h de la inducción con galactosa. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar. Se realizó la prueba de t, con corrección de Welch para determinar diferencias estadísticas simbolizadas con *.

Por lo tanto, las levaduras transformantes que poseen el ITRG 1 bajo el comando del promotor de galactosa son capaces de tolerar entre tres a cuatro veces mejor las condiciones a las cuales fueron expuestas en estos experimentos. Mostrando una mayor tolerancia a zinc y cadmio, creciendo cinco veces más que el control. El comportamiento de cultivos de levaduras transformadas con la construcción pYES-ITRG 2 se muestran en la figura 17. Las levaduras transformadas con la construcción que posee el marco abierto de lectura de ITRG2 presentan mayor tolerancia al catión sodio, cuando este metal se encuentra a una concentración de 100 mM, alcanzando a ser cuatro veces más alta que el control sin inserto (SI). En tanto, en las otras dos concentraciones, igualmente se observa un mayor crecimiento, aunque las diferencias son modestas. Para los tratamientos con zinc, la cepa transformante con ITRG2 mostró hasta 5 veces mayor tolerancia con respecto al control (Figura 17B). Al efectuar la incubación con cobalto, los cultivos sometidos a 100 μ M y 250 μ M mostraron un crecimiento aproximado de 4 veces el registrado para los controles (Figura 17 C). El crecimiento relativo observado para las incubaciones con cobre evidencia diferencias para la concentración más baja evaluada (500 mM). En tanto, para las otras dos concentraciones los resultados de las levaduras que poseen ITRG 2 son similares a los mostrados para los controles (Figura 17D). En los tratamientos con cadmio, se observó una mayor tolerancia de los cultivos de levaduras transformadas con el ITRG2 frente a todas las concentraciones empleadas de este metal (Figura 17 E), alcanzando niveles de hasta cuatro veces el crecimiento mostrado por el control. Con lo observado, se puede determinar que las levaduras transformadas con la construcción pYES-ITRG2 presentan una tolerancia múltiple. Es decir, se logran mayores tolerancias que en las cepas con el vector vacío, en gran parte del estudio efectuado.

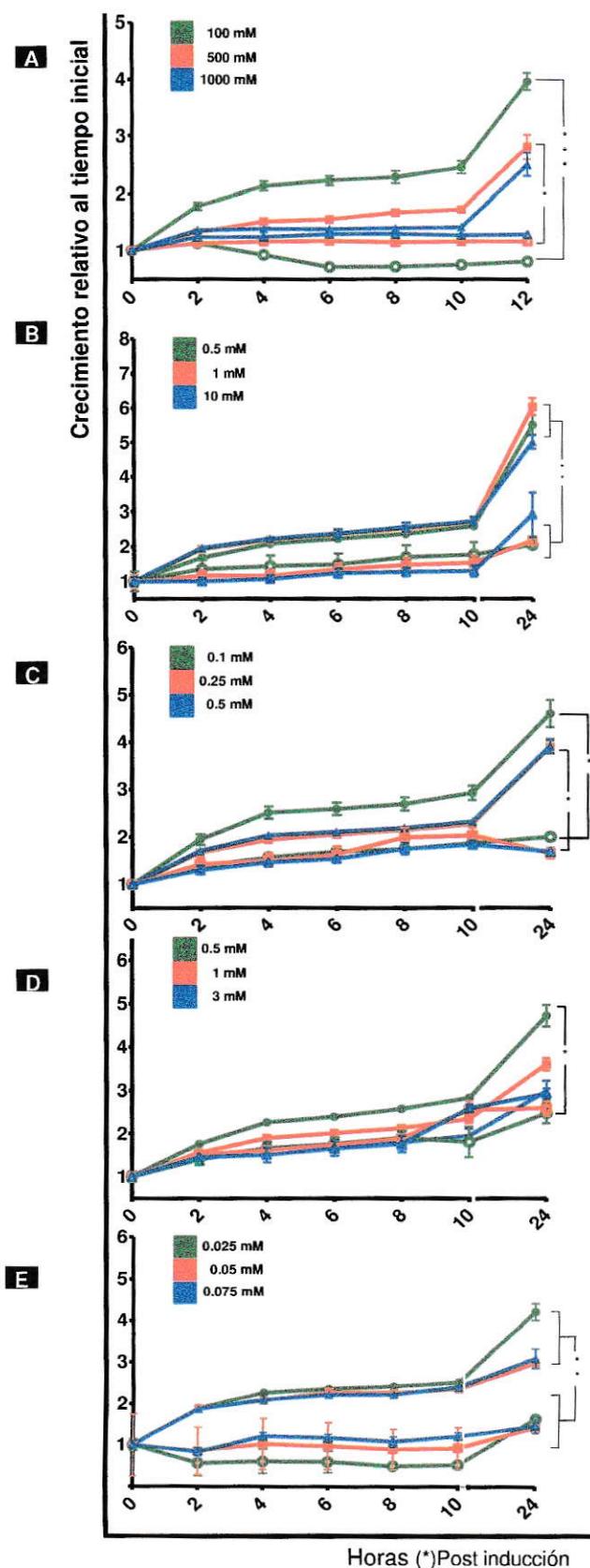


Figura 17: **Tolerancia de levaduras transformadas con pYES-ITRG 2.** Se muestra la tolerancia de levaduras transformantes en presencia de NaCl (A), ZnCl₂ (B), CoCl₂(C), CuSO₂ (D) y CdCl₂ (E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada sal metálica, indicadas en la figura. En las gráficas se informa el crecimiento relativo al tiempo inicial. , y corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pYES-ITRG 2. , y corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las cuales fueron incubadas los cultivos de levaduras transformadas con el vector sin inserto. Los experimentos se realizaron luego de 6 h de una inducción con galactosa. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar. Se realizó la prueba de t, con corrección de Welch para determinar diferencias estadísticas simbolizadas con *.

El resultado de los experimentos realizados para determinar la tolerancia de las levaduras transformadas con la construcción pYES-ITRG 3, se observa en la figura 18.

Al incluir Na^+ en el medio de crecimiento de las levaduras (Figura 18 A), se observa una marcada diferencia en la tolerancia de las levaduras transformadas con ITRG 3 frente al control en los 100 mM, mostrando 4 veces mayor crecimiento relativo. En los tratamientos con las otras dos concentraciones de sodio, el crecimiento es similar a los controles. Aunque al final del seguimiento (12 h), aumenta levemente la diferencia.

Al analizar los resultados obtenidos para los tratamientos realizados con Zn^{2+} (Figura 18B), se ve una diferencia en el crecimiento sin embargo no se observa una dosis dependencia entre las levaduras transformadas con ITRG3 y los controles.

En la Figura 18 C se observa que las levaduras transformadas por pYES-ITRG 3 no presentan diferencias significativas con los controles durante el transcurso del experimento, por lo tanto las levaduras transformadas con el vector que posee ITRG3, al comportarse de manera similar a los controles no manifiestan tolerancia ni sensibilidad al cobalto.

En los tratamientos realizados con Cu^{2+} 500 μM y 1 mM hay una diferencia notoria entre las levaduras que expresan ITRG 3 con los controles, en tanto para la otra concentración de cobre el crecimiento es diferente con un nivel menor de significancia entre las transformantes y los controles (Figura 18 D). Se observa, en general, un efecto de dosis dependencia. Es decir, mientras mayor es la concentración del metal, menos crecen las levaduras. Mostrando una diferencia de hasta aproximadamente seis veces en la concentración de 0.5 mM.

Para los tratamientos con Cd^{2+} (Figura 18, E), se aprecia una mayor tolerancia en las tres concentraciones evaluadas, mostrando 3 o 4 veces el crecimiento relativo en comparación con el control. De esta forma, en general, se encontró que al transformar levaduras con una construcción que posee el gen ITRG 3, comandado por un promotor inducible por galactosa, éstas poseen una tolerancia selectiva, particularmente a Sodio, Zinc, Cobre y Cadmio.

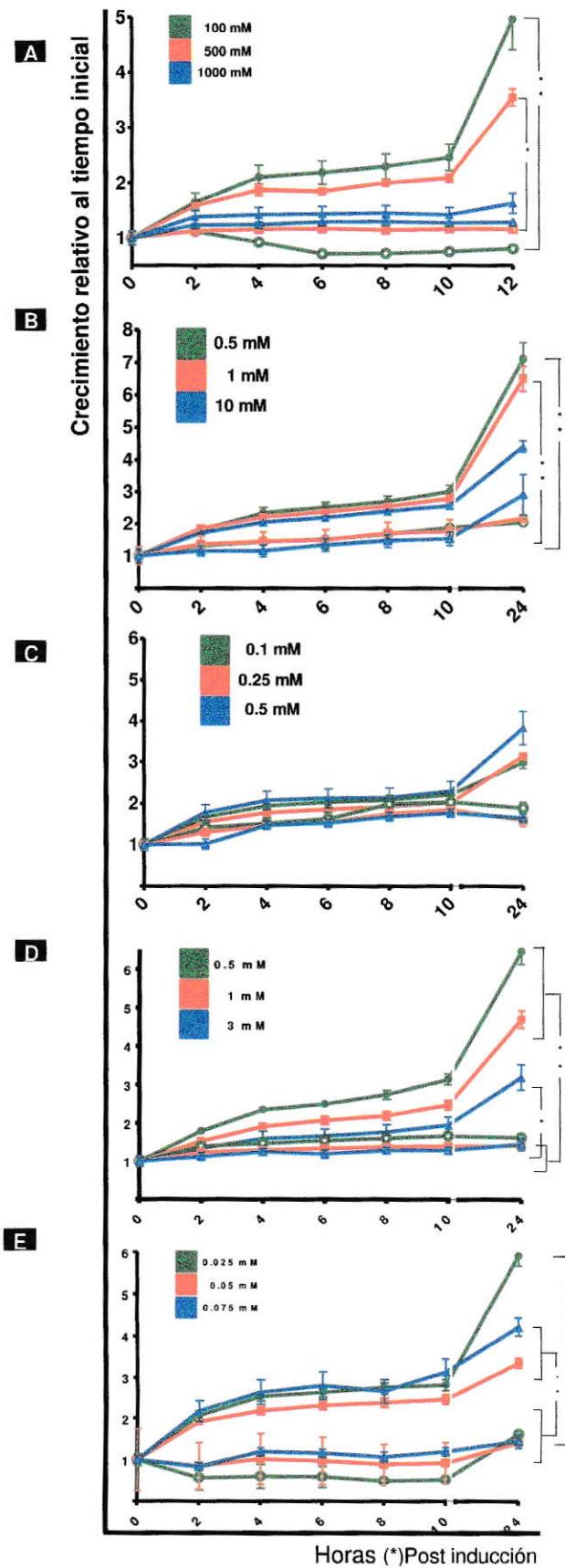


Figura 18: **Tolerancia de levaduras transformadas con pYES-ITRG 3.**

Se muestra la tolerancia de las levaduras transformantes a Na^+ (A), Zn^{2+} (B), Co^{2+} (C), Cu^{2+} (D) y Cd^{2+} (E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada metal, indicadas en la figura. En las gráficas se informa el crecimiento relativo al tiempo inicial. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar. \bullet , \blacksquare y \blacktriangle corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pYES-ITRG 3. \circ , \square y \triangle corresponden a las distintas concentraciones* de los cationes metálicos con las cuales fueron incubadas los cultivos de levaduras transformadas con la construcción pYES-VV. Los experimentos se realizaron una vez que previamente, por un tiempo de 6 h, se indujeron con galactosa los promotores de las construcciones transformadas en las levaduras. *: Indicadas en la figura.

3.3.2 Evaluación de la tolerancia de *S. cerevisiae* transformadas construcciones de promotor con expresión constitutiva.

Para determinar el comportamiento de levaduras con una expresión permanente de las proteínas codificadas por los genes ITRG, se transformaron levaduras con construcciones en vectores con promotor constitutivo (promotor GPD426) comandando la expresión de los genes ITRG. Luego, se realizó el estudio de la tolerancia de las levaduras transformantes.

Con el objetivo de determinar si el tamaño o el tipo de secuencia usada para identificar las proteínas ITRG podrían influir en la acumulación de estas, o bien en el crecimiento frente a incubaciones con cationes metálicos, se diseñaron y realizaron dos tipos de construcciones.

3.3.2.1 Evaluación de la tolerancia de *S. cerevisiae* transformadas con las construcciones realizadas con el vector pAG426GPD-*ccdB*-HA.

Para realizar los experimentos correspondientes a las levaduras transformadas con las construcciones pAG426GPD-ITRG1-HA y pAG426GPD-ITRG3-HA, un pre-inoculo de 12 horas de crecimiento previo fue utilizado como cultivo de partida, para luego ser incubadas con los distintos cationes metálicos. Los resultados para las levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 1-HA y pAG426GPD-ITRG 3-HA se registraron durante 20 h, para observar los efectos a más largos plazos.

En la Figura 19, parte A, se muestra que en presencia de Na⁺ 100 mM las levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG1-HA, presentan menor crecimiento que las transformadas con pAG426GPD-*ccdB*-HA (vector control, sin inserto), mostrando diferencias de alrededor de un 25% con respecto al crecimiento mostrado por las levaduras que poseen la construcción con el ORF de ITRG 1. En

tanto, los cultivos sometidos a 500 mM y 1000 mM se comportan de manera similar las levaduras transformadas con el ORF de ITRG1 y los que poseen el vector sin inserto.

Al coincubar las levaduras con Zn^{2+} , se observó que presentan un mayor crecimiento aquellas transformadas con el vector sin inserto, en comparación con las levaduras que poseen una construcción que incluye ITRG1, esto se observa en las tres concentraciones evaluadas (0.5, 1 y 10 mM). El crecimiento registrado para ambos tipos de transformantes (pAG426GPD-ITRG 1-HA y el vector sin inserto) muestra un comportamiento grupal en las tres concentraciones de este metal, es decir las levaduras transformadas con el vector sin inserto crecen aproximadamente a la misma tasa al someterlas a una concentración de 500 μ M, 1mM y 10 mM, al igual que las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG 1-HA, pero en menor grado, como se ve en la Figura 19 B. Esto indicaría que las distintas concentraciones no afectan de manera diferencial a los cultivos, no así como el que estén o no transformadas con ITGR1.

Los cultivos de levaduras transformados con la construcción pAG426GPD-ITRG 1-HA se muestran más sensibles al cobalto (Figura 19C) en comparación con las transformadas con el vector sin inserto. Mostrando las levaduras transformadas con el vector sin inserto un crecimiento dosis dependiente, mientras mayor es la concentración del metal, menor es el crecimiento. En los experimentos realizados con cobre, se observó una inestabilidad en las curvas de crecimiento, no pudiéndose determinar diferencias de en este parámetro. Esto se puede observar en la Figura 19 D. Al someter a las levaduras a distintas concentraciones de cadmio, se observó que las transformadas con el vector sin inserto poseen mayor crecimiento que aquellas transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG1-

HA. Visualizándose que las levaduras transformadas con el vector sin inserto muestran un crecimiento dosis dependiente, en el que hay un mayor crecimiento a medida que aumenta la concentración (Figura 19 E).

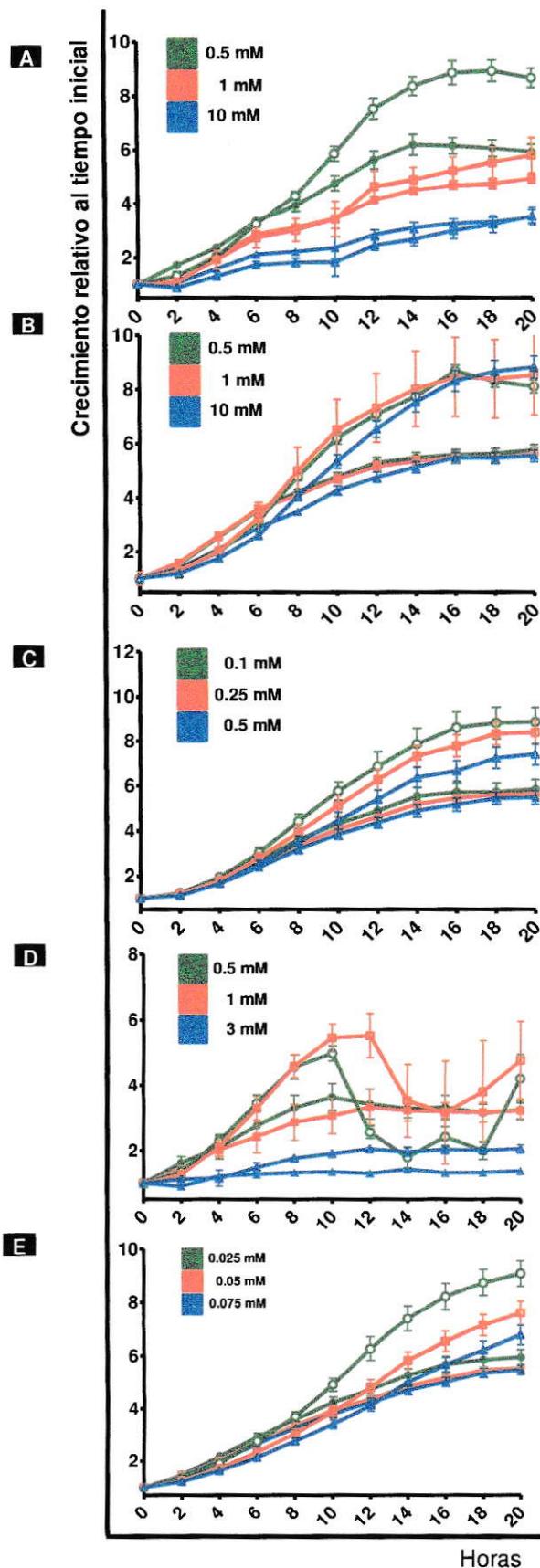


Figura 19: **Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 1-HA.**

Se muestra la tolerancia de las levaduras transformadas a Na^+ (A), Zn^{2+} (B), Co^{2+} (C), Cu^{2+} (D) y Cd^{2+} (E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada metal, indicadas en la figura. En las gráficas se informa el crecimiento relativo al tiempo inicial. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar.

●, ■ y ▲ corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pAG426GPD-ITRG 1-HA.

○, □ y ★ corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las cuales fueron incubadas los cultivos* de levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ccdB-HA (SI).

*: Indicadas en la figura.

En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos en términos de tolerancia para las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG3-HA.

En la parte A de la Figura 20 se observa que hasta 14 h después de incubadas con sodio, el crecimiento es muy similar, sin embargo después de este periodo, cambia, mostrando más tolerancia las levaduras que poseen ITRG3 en comparación con las que poseen el vector sin inserto en 100 mM y 500 mM de Na⁺.

Los cultivos de levaduras transformados con el ORF de ITRG3 al ser coincubados con zinc (Figura 20B), muestran un comportamiento similar para las levaduras que tienen el inserto de ITRG 3 y aquellas con el vector sin inserto. Además, las curvas de crecimiento para las distintas concentraciones de este metal describen las mismas tendencias y valores.

Al tratar las levaduras con cobalto (Figura 20C) se observa un comportamiento similar de las curvas de crecimiento de las levaduras que poseen el ORF de ITRG 3 y aquellas con el vector sin inserto. Sin embargo, entre las 8 y las 14 h del tratamiento con cobalto 0.1 mM, se ve un pequeño crecimiento diferencial mayor de las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG3-HA en comparación con las transformadas con el vector sin inserto.

En los experimentos realizados con cobre (Figura 20 D), las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG3-HA muestran mayor crecimiento para las concentraciones de 0.5 mM y 1mM, en tanto para 3mM ambas curvas, ITRG 3 y la del vector sin inserto, se comportan de la misma forma, sin registrar crecimiento.

En los tratamientos con cadmio, las curvas observadas para cada concentración (Figura 20E), son similares al comparar las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG3-HA y las transformadas con el vector sin inserto.

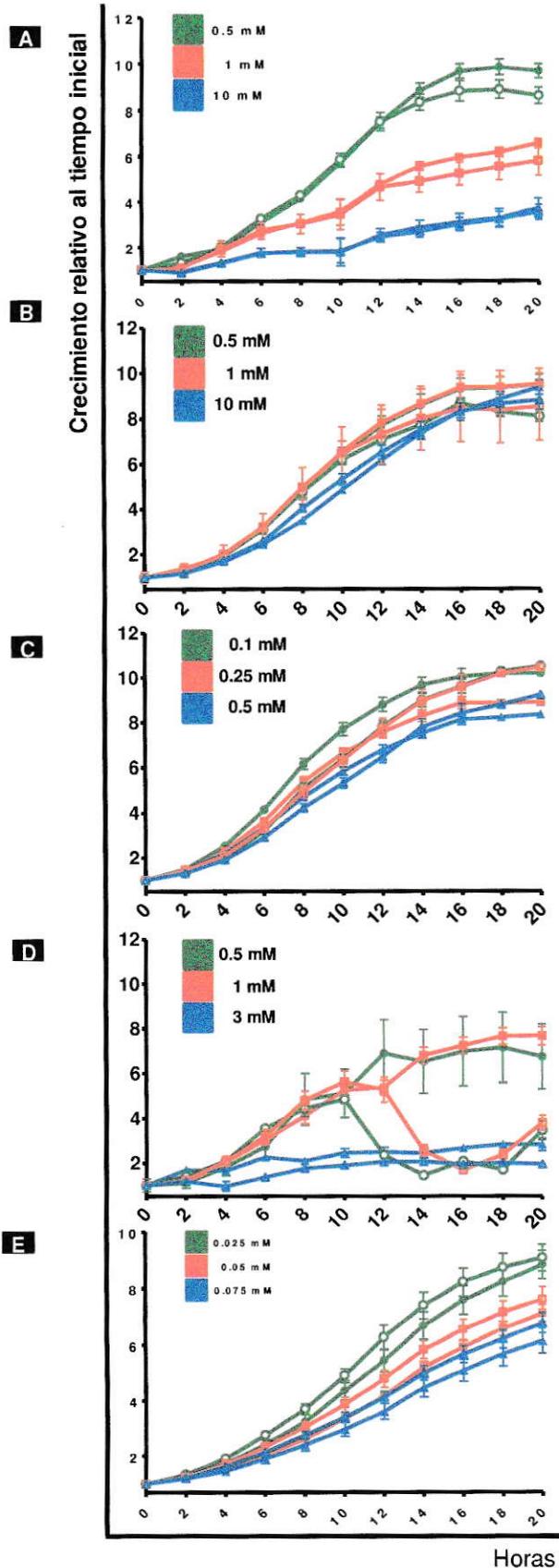


Figura 20: Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 3-HA. Se muestra la tolerancia de las levaduras transformantes a Na⁺ (A), Zn²⁺ (B), Co²⁺(C), Cu²⁺(D) y Cd²⁺(E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada metal, indicadas en la figura. En las gráficas se informa el crecimiento relativo al tiempo inicial. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar. , y corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pAG426GPD-ITRG 3 -HA. , y corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las cuales fueron incubadas los cultivos* de levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ccdB-HA (SI). *: Indicadas en la figura.

3.3.2.2 Evaluación de la tolerancia de *S. cerevisiae* transformadas con construcciones realizadas con el vector pAG426GPD-ccdB-GFP.

Para determinar el comportamiento de las levaduras transformadas con construcciones que tuvieran un promotor constitutivo y una proteína marcadora fusionada, como EGFP, se realizaron los análisis que serán detallados. Además es interesante determinar si existe alguna diferencia al etiquetar proteínas, con pequeñas moléculas como HA, o grandes moléculas como lo es EGFP, ambas moléculas de fusión comandadas por el mismo promotor. Se transformaron levaduras con las construcciones pAG426GPD-ITRG1-GFP, pAG426GPD-ITRG2-GFP y pAG426GPD-ITRG3-GFP, con estas transformantes se efectuaron experimentos de tolerancia análogos a los descritos anteriormente para las levaduras transformadas con las distintas construcciones que codifican proteínas fusionadas al epítopo HA.

En la Figura 21 se muestran las curvas de crecimiento descritas para las incubaciones con los distintos metales para las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG1-GFP. En Figura 21A se observa que al someter las levaduras a una concentración final de sodio de 100 mM y 500 mM, aquellas transformadas con el vector sin inserto muestran un mayor crecimiento que las que poseen ITRG 1. Mientras que con sodio 1000 mM se observa un comportamiento similar en ambos tipos de cultivos.

En la Figura 21, parte B se muestra que los cultivos de levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG1-GFP y las transformadas con el vector sin inserto muestran un crecimiento similar en todas las concentraciones de zinc (0.5 mM, 1 mM y 10 mM).

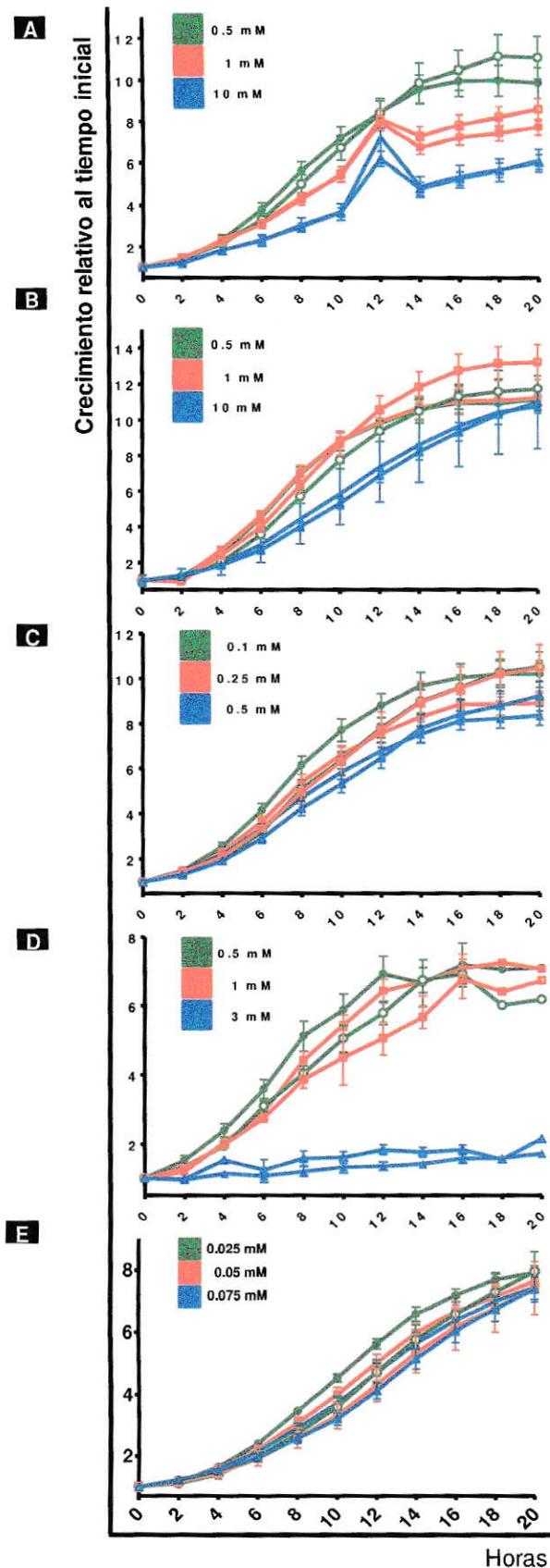


Figura 21: Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 1-GFP.

Se muestra la tolerancia de las levaduras transformantes a Na^+ (A), Zn^{2+} (B), Co^{2+} (C), Cu^{2+} (D) y Cd^{2+} (E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada metal, indicadas en la figura.

En las gráficas se informa el crecimiento relativo al tiempo inicial. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar.

\circ , \square y \triangle corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pAG426GPD-ITRG 1-GFP.

\circ , \square y \triangle corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las cuales fueron incubadas los cultivos* de levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ccdB-HA (SI). *: Indicadas en la figura.

En los tratamientos realizados con cobalto (Figura 21 C), se muestra que para la concentración de 0.1 mM, entre las 10 y 14 h después de iniciar la co-incubación con el metal, las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG 1-GFP, tienen un mayor crecimiento que las transformadas con el vector sin inserto. Mientras que en las otras dos concentraciones finales utilizadas ocurrió lo contrario, aunque es difícil determinar exactamente si existen diferencias, debido a lo cercano que se presentan las curvas.

Al analizar el crecimiento registrado por los cultivos de levaduras al ser co-incubadas con cobre (Figura 21 D), se observa que para las concentraciones de 0.5 mM y 1 mM, en promedio, crecen levemente más las levaduras que poseen ITRG1, en comparación con las transformadas con el vector sin inserto. En los experimentos realizados con Cd^{2+} (Figura 21 E), se encontró que a 0.025 mM de este metal, las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG1-GFP muestran leve mayor crecimiento que las transformadas con el vector sin inserto. A pesar de lo anterior, es difícil determinar un mayor o menor crecimiento por parte de las distintas levaduras, debido a que en general el crecimiento fue similar para todas las concentraciones.

A modo de resumen, según lo observado, las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG1-GFP muestran una leve tolerancia hacia las menores concentraciones de los metales Co^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} . Sin embargo en ninguna co-incubación se observaron diferencias significativas que permitan concluir o determinar una tendencia o una tolerancia total.

En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la tolerancia en levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG2-GFP, en comparación con las transformadas con el vector sin inserto.

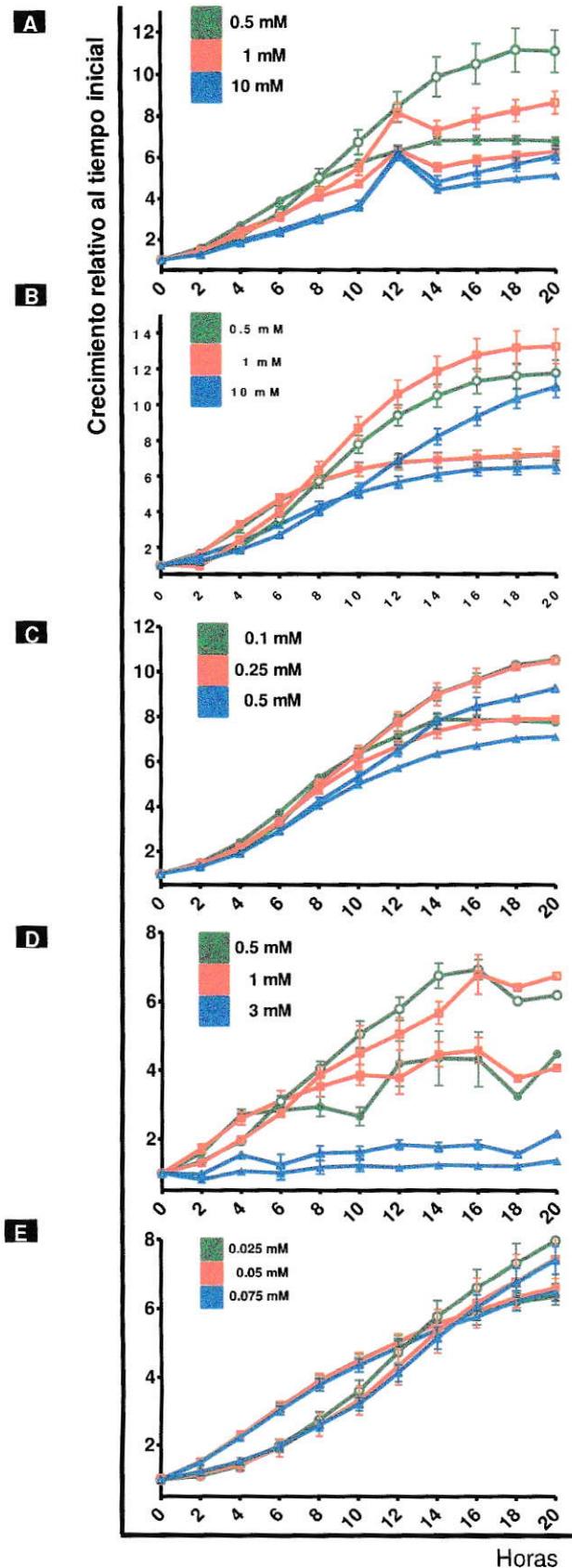


Figura 22: **Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 2-GFP.** Se muestra la tolerancia de las levaduras transformantes a Na⁺ (A), Zn²⁺ (B), Co²⁺(C), Cu²⁺(D) y Cd²⁺(E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada metal, indicadas en la figura. En las gráficas se informa el crecimiento relativo al tiempo inicial. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar. ,  y  corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pAG426GPD-ITRG 2-GFP. ,  y  corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las cuales fueron incubadas los cultivos* de levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ccdB-HA (SI).-: indicadas en la figura.

En el tratamiento mostrado con sodio (Figura 22 A), se observa que las levaduras transformadas con el vector sin inserto son más tolerantes que las que poseen el ORF de ITRG 2. El control presenta mayor crecimiento con 100 mM que con 500 mM y registrándose los menores valores con 1M. Se muestra además que los cultivos de levaduras que poseen el inserto de ITRG 2 crecieron de manera similar al ser sometidos a las tres concentraciones.

En los tratamientos realizados con zinc (Figura 22B) se observa que los cultivos que poseen levaduras transformadas con el vector sin inserto, crecen más que las transformadas con el ORF de ITRG 2. Estos últimos muestran un crecimiento similar a todas las concentraciones de zinc. Al analizar el crecimiento de los cultivos de levaduras coincubados con cobalto (Figura 22 C), se observa que los cultivos controles crecen más que aquellos que poseen el ITRG 2. Al incubar las levaduras transformantes con cobre en distintas concentraciones (Figura 22 D), se observó que para las dos concentraciones menores (0.5 mM y 1 mM) las levaduras transformadas con el vector sin inserto muestran un crecimiento mayor que las transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG2-GFP, mientras que cuando se someten las levaduras a una concentración final de 3 mM de cobre, estas no presentan crecimiento diferencial significativo entre las levaduras transformadas con el ORF de ITRG2 y el control.

Los experimentos llevados a cabo incubando levaduras transformantes con cadmio se muestran en la parte E de la Figura 22, ahí se observa un comportamiento bifásico. Hasta aproximadamente 12 h desde que se inicia la incubación con el metal, las levaduras que poseen el inserto correspondiente al ORF de ITRG 2 muestran mayor crecimiento que las transformadas con el vector sin inserto, sin embargo después de las 12 h, el comportamiento se invierte siendo las levaduras

transformadas con el vector sin inserto las que muestran mayor tolerancia al metal en todas las concentraciones. Entonces, las levaduras que poseen la construcción pAG426GPD-ITRG2-GFP en presencia de cadmio, muestran un comportamiento dependiente del tiempo de exposición al metal.

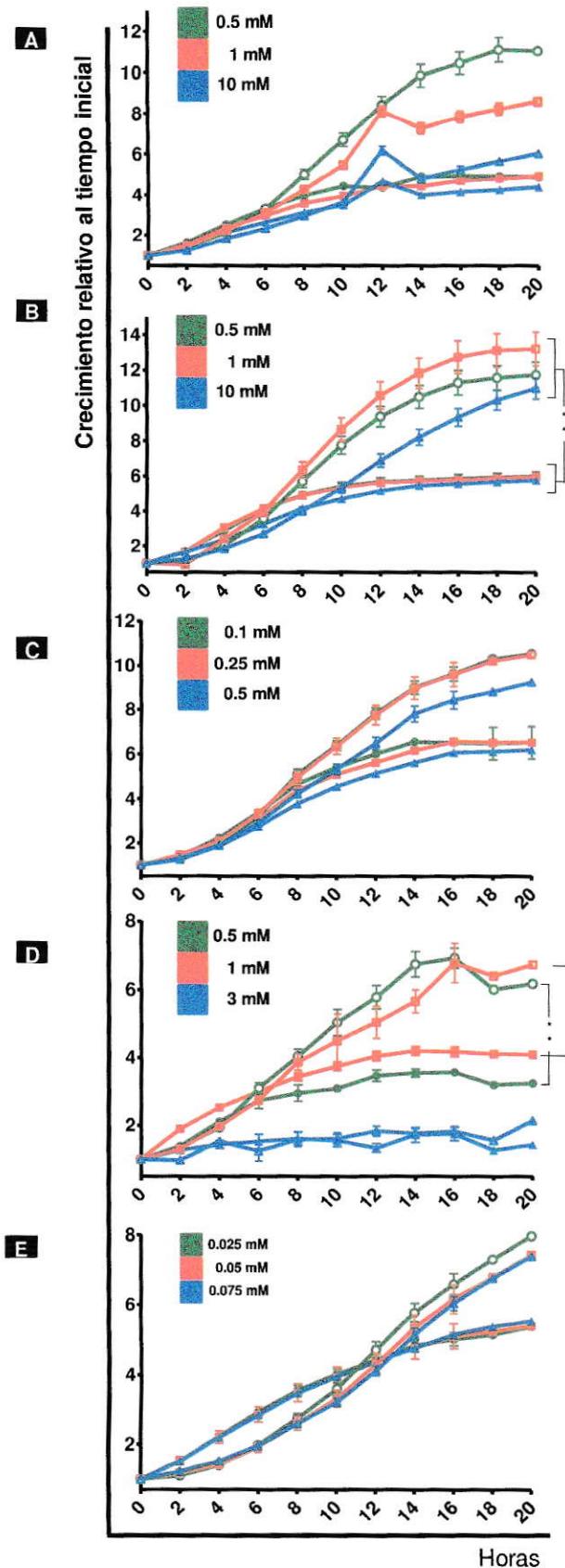


Figura 23: **Tolerancia de levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 3-GFP.** Se muestra la tolerancia de las levaduras transformantes a Na^+ (A), Zn^{2+} (B), Co^{2+} (C), Cu^{2+} (D) y Cd^{2+} (E). Se evaluaron 3 concentraciones para cada metal, indicadas en la figura. En las gráficas se informa el crecimiento relativo al tiempo inicial. Cada punto graficado corresponde a un promedio y al error estándar. \circ , \square y \star corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las que fueron incubados los cultivos transformados con pAG426GPD-ITRG 3-GFP \circ , \square y \star corresponden a las distintas concentraciones de los cationes metálicos con las cuales fueron incubados los cultivos* de levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ccdB-HA (SI). *: Indicadas en la figura.

En la Figura 23 se observa el crecimiento de cultivo de levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG 3-GFP frente a cultivos de levaduras controles.

En la Figura 23A se observa el crecimiento de los cultivos de levaduras coincubados con sodio, se ve que a la concentración de 100 mM las levaduras controles crecen alrededor de 2.5 veces más que las que poseen el inserto de ITRG 3. Este comportamiento también se observa a 500 mM, pero en menor grado. En la mayor concentración de sodio, 1000 mM, el comportamiento es similar entre ambos tipos de transformantes.

En los tratamientos con zinc (Figura 23B) se observa que para las tres concentraciones utilizadas, 0,1 mM, 5mM y 10 mM los cultivos de levaduras transformadas con el vector sin inserto tienen un mayor crecimiento que aquellas que poseen el inserto del ITRG3. Las levaduras controles muestran una menor tasa de crecimiento a medida que aumenta la concentración de zinc.

Al incubar las levaduras transformadas con cadmio (Figura 23C), las controles crecen más que las transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG 3-GFP, esto en las tres concentraciones evaluadas, mostrando un crecimiento similar los controles para 0.1 y 0.25 mM de cadmio, mientras que para la concentración más alta, de 0.5 mM el crecimiento baja, acercándose al mostrado por las levaduras que poseen el ORF de ITRG3 fusionado a EGFP.

En la Figura 23D, se observa que al incubar las levaduras que poseen el ORF de ITRG a cobre, estas presentan un crecimiento inicial que luego se detiene, alrededor de las 6 h, tanto para la concentración de 0.5 y 1 mM de cobre, alcanzando niveles de crecimiento relativo similares. Mostrando sensibilidad luego de las 6 h, en comparación con los controles. Para cobre 3mM no se observaron

diferencias en el crecimiento entre el control y las levaduras que poseen el ORF de ITRG3 fusionado a EGFP.

En lo mostrado en tratamientos de incubación con cobalto para las levaduras transformadas pAG426GPD-ITRG3-GFP(Figura 23E), se aprecia que tienen un comportamiento similar a las levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG 2-GFP, es decir muestran gráficas de crecimiento bifásicas, donde en una etapa temprana del tratamiento muestran mayores tasas de crecimiento que los controles, hasta alrededor de las 12 horas, luego de este tiempo, se hacen más sensibles al metal en todas las concentraciones evaluadas de cobalto.

En resumen, las construcciones realizadas para los ORF codificantes para ITRG 2 y ITRG 3, comandadas bajo el promotor 426GPD y fusionadas con EGFP inducen sensibilidad a las levaduras para Na^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} . El fenómeno del Cd^{2+} es distinto debido a que se observa un comportamiento bifásico dependiente del tiempo, lo cual podría estar involucrado con una posible alteración en la fisiología de la levadura.

También se realizaron pruebas de tolerancia con los controles utilizados en los experimentos relacionados con la acumulación de proteínas (Sección 3.2.3.1). Es decir, levaduras transformadas con construcciones que incluían ITRG 3 AS y Gonst4 (datos no mostrados), observándose un comportamiento similar a los controles de vector sin inserto de interés (SI).

Discusión

4.1 Selección y caracterización de genes de *A.thaliana* relacionados a la función de transporte iónico.

4.1.1 Genes con alta probabilidad de estar involucrados en el metabolismo iónico.

En la red de co-expresión realizada se evaluó el enriquecimiento de una etiqueta de GO particular, transporte iónico (GO:0006811, Ion transport). Se estudió qué genes, en el genoma de *Arabiopsis thaliana*, fueron conectados por genes que poseían esta etiqueta. Esta parte de la investigación fue realizada por el Dr. Alexander Vergara. El análisis se efectuó mediante dos mecanismos, por simple conteo del vecindario más próximo y utilizando el método de enriquecimiento hipergeométrico (Sharan et al., 2007). Ambos métodos tienen sus ventajas y desventajas. El primero se basa en observar el vecindario de los genes y por simple conteo de vecinos, se le asigna una etiqueta. Obteniéndose muchos genes candidatos a estar involucrados en un determinado proceso. Sin embargo, este análisis no estima la posible sobrerrepresentación que pudiera tener esta etiqueta en el genoma, es decir, cuan “*impura*” o “*promiscua*” puede ser la denominación de la etiqueta, debido a que en todo el genoma existen genes presentes en procesos metabólicos generales, por lo tanto aparecen representados en múltiples condiciones. Por otro lado se encuentra el enriquecimiento hipergeométrico, basado en el modelo de distribución hipergeométrica, el cual corresponde a una distribución discreta relacionada con muestreos aleatorios y sin reemplazo de datos. Este método

contempla el factor de sobre representación de una determinada etiqueta, encontrando con mayor exactitud los mejores resultados. En base a este punto, pareciera ser que el análisis más certero es el enriquecimiento hipergeométrico, sin embargo entrega un bajo número de resultados que podrían dejar a buenos candidatos fuera del análisis. Por lo tanto se debe trabajar con un equilibrio entre estos dos métodos, es decir, conocer ambos resultados y en base a estos, lograr encontrar los mejores genes candidatos para estar implicados en un proceso biológico, tener una determinada función molecular y ubicación celular. Para la investigación realizada, la red contó con ambos análisis y las debidas pruebas de validación, asegurando que no se trataba de una red al azar. Por lo tanto, se debe escoger el método con mayor parsimonia adecuado a la pregunta biológica planteada, contemplando las fortalezas y debilidades del conteo de vecindario y el enriquecimiento hipergeométrico.

No obstante, otro aspecto importante es el conocimiento de las funciones de los genes seleccionados, disponibles a la fecha en trabajos científicos y bases de datos donde esta información se concentra. Es imprescindible el análisis de los datos existentes ya que permite obtener argumentos para discriminar entre diferentes opciones durante la investigación. Esto es limitado e incompleto, ya que por ejemplo, hasta en la última actualización del TAIR, en Noviembre del año 2010, se conocían sólo las funciones moleculares de un 60% del genoma de *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org, Noviembre 2010). La información obtenida, cruzada con nuestros intereses permitió definir un criterio para analizar los datos entregados por la red de coexpresión.

Existen múltiples estudios de co-expresión realizados en distintos organismos, incluyendo *Arabidopsis*, donde estos análisis han reportado exitosas predicciones

de funciones de genes(Cohen y col. 2000; Lercher y col. 2002; Spellman y Rubin 2002; Lercher y col. 2003; Williams y Bowles 2004b; Ren y col. 2005; Aoki y col. 2007). Por lo tanto, contemplando esta experiencia, determinamos que nuestra propuesta representa una excelente herramienta de búsqueda de nuevos genes implicados en un proceso determinado. La cual, es distinta a lo que se ha hecho clásicamente en la búsqueda de nuevos genes como la mutación al azar o la genotipificación de cepas extremófilas. En esta investigación se buscaron genes nuevos involucrados en el transporte iónico, que pudieran abrir una nueva línea de investigación relacionada con la tolerancia a estrés salino y estrés por metales pesados.

Los 12 genes encontrados mediante el análisis de coexpresión de vecindario poseen una alta posibilidad de estar involucrados en el proceso de transporte iónico, debido a que utilizamos como método de coincidencia la etiqueta molecular transporte iónico. Al analizar las etiquetas moleculares (GO) de los genes vecinos a los doce genes identificados en la red de co-expresión, cada uno de ellos, se encontró que las etiquetas sobre-representadas son transporte iónico y transporte de cationes (Figura 7). Este hecho apoya plenamente la red realizada, debido a que aquellos genes conectados con los pertenecientes a la lista de los ITRG, poseen el mismo GO de transporte iónico o uno altamente relacionado con esa categoría como lo es transporte de cationes.

Con las características del vecindario de los genes con más probabilidad de estar implicados en el transporte iónico y las características estudiadas de los doce ITRG, se decidió por comenzar el estudio con los ITRG1, 2 y 3. Los tres genes escogidos, tienen como característica en común, anotaciones relacionadas con el metabolismo energético, específicamente en la fosforilación oxidativa. Existe la posibilidad de

que estos genes se ubiquen tanto en el cloroplasto como en la mitocondria, debido a su anotación de fotorrespiración. Sin embargo, debido a que las plantas se relaciona a través de su tejido radicular con los agentes que causan el estrés iónico, asumimos que en esa parte de la planta, es donde más se necesita producción energética. Ya que la raíz carece de luz, esta producción energética se realizaría en la mitocondria a través de la respiración celular mitocondrial.

El proceso de la fosforilación oxidativa ocurre en la mitocondria de todas las células eucariontes. Por efecto de la cadena transportadora de electrones, la donación de electrones desde el NADH produce un desbalance de protones (H^+), expulsándose estos hacia el espacio intermembrana, disminuyendo el pH con respecto a la matriz mitocondrial. Esta diferencia de cargas inducida por el desequilibrio de H^+ , llamada fuerza protón motriz, permite el funcionamiento de la bomba ATP sintasa. En experimentos de hipoxia en cereales, se ha demostrado que la falta de oxígeno modifica ostensiblemente la relación de cationes de potasio (K^+) y sodio (Na^+) dentro de las células. Esto, debido a que la disminución de oxígeno provoca un bloqueo de la cadena transportadora de electrones, por la falta de una molécula dadora de electrones (Colmer y Greenway, 2011). De esta forma, es posible que genes implicados en la cadena transportadora de electrones estén relacionados a la modificación de la tolerancia/sensibilidad a cationes metálicos como el K^+ o el Na^+ .

Por otro lado, en mitocondrias aisladas de células de hígado de rata, se determinó que cationes metálicos de cadmio (Cd^{2+}) y de cobre (Cu^{2+}) afectan la cadena transportadora de electrones, el canal uniporter de Ca^{2+} y la permeabilidad de los poros de transición de los efectores en la función mitocondrial, perturbada por los metales pesados. Determinándose que el blanco de los metales pesados en la mitocondria es la cadena transportadora de electrones (Belyaeva et al., 2011). En el

mismo modelo también se describió que al bloquear la cadena transportadora de electrones, con la sustancia “*stigmatellin*”, se logra un efecto de protección frente a los metales pesados, lo que podría interpretarse como un método de tolerancia frente a Cd^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} o Ca^{2+} (Belyaeva, 2010).

Junto con lo anterior, recientemente se describió el fuerte lazo que existe entre el bloqueo de la cadena transportadora de electrones y el aumento de la captación de hierro en mitocondrias de líneas celulares humanas (Mena y col. 2011). Al bloquear la cadena transportadora de electrones, disminuye el ATP y por lo tanto no se forma el complejo hierro azufre (Fe-S), de esta forma la célula no es capaz de determinar la presencia del hierro. Al inhibir la cadena transportadora de electrones se alteran la expresión de transportadores tanto de dominio citoplasmáticos como mitocondriales, de manera de captar más hierro y formar los complejos Fe-S (Mena y col. 2011). Además, múltiples mecanismos de detoxificación celular emplean ATP para su funcionamiento, por lo tanto, es esperable que al haber mayor cantidad de ATP disponible, se modifique el estado basal de respuesta ante la movilización de metales en la célula (Serrano y Rodríguez-Navarro 2001).

Se hicieron análisis de las secuencias de los genes ITRG1, 2 y 3 utilizando las bases de datos disponibles en la web para determinar su localización subcelular en *Arabidopsis*. Estas bases de datos emplean distintos criterios de decisión para estimar la posible localización subcelular, relacionados en su mayoría con características fisicoquímicas de las secuencias, composición aminoacídica y algunos algoritmos de predicción.

Lo interesante de estos análisis, es que los resultados de las predicciones son similares a los informados en la base de datos de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org). A pesar de que la fuente de información de estos últimos

datos para determinar la ubicación subcelular, en su mayoría provenientes de estudios de proteómica publicados y curados (Millar y col. 2001; Heazlewood y col. 2004; S. K. Mitra y col. 2007), dado que ambos tipos de evidencias indican que los productos proteicos codificados por ITRG1, 2 y 3 se localizan en la mitocondria hace la predicción relacionada con la función de los genes, bastante posible.

Ya que los datos de microarreglos realizados utilizando como organismo de estudio *Arabidopsis thaliana* se encuentran disponibles de manera libre, estos se pueden analizar empleando distintos enfoques. Con el interés de hacer una descripción más detallada y guiada hacia nuestro interés de encontrar genes nuevos involucrados en el transporte de iones, es que analizamos el comportamiento de los genes de interés (ITRG1, 2 y 3), frente a los estímulos que guardaran una mayor relación con nuestro objetivo. En particular se analizaron los datos provenientes de plantas sometidas a estrés salino y estrés osmótico, se observó que en general el comportamiento de los genes es constante con el paso del tiempo, es decir, no se supera el doble del valor registrado para los controles. El que cambie al menos 2 veces se emplea clásicamente para determinar si existe un cambio o no en un nivel de expresión entre 2 condiciones de estudio (Draghici, 2002). A pesar de esto, analizando específicamente los perfiles de expresión, el ITRG 9, en los datos correspondientes a la parte aérea en estrés salino, presenta un alza en la acumulación de mRNA en el tiempo, en comparación con el resto de datos, lo cual es similar a lo que ocurre en estrés osmótico. Se esperaba que hubiera un cambio mayor de la expresión en las muestras correspondientes a la raíz, tejido donde se estaría interactuando directamente con los metales, por lo tanto, si decidiéramos con este criterio, este gen no resulta un buen candidato, De todas formas, es importante señalar el hecho de que los 3 genes escogidos muestran un perfil de

expresión similar en ambos tejidos analizados, frente a los 2 estreses. Este hecho podría tener relación con que los genes estén bajo el dominio del mismo tipo de promotor, por ende, su transcripción ocurra bajo el mismo estímulo e intensidad o por otro lado, sean parte de un proceso molecular común. Por lo tanto podrían denotar un posible comportamiento similar al transformar otra especie con estos genes. En tanto, de forma micro, existe una variación antagónica entre las acumulaciones de los mensajeros de las plantas sometidas a estrés osmótico y salino para estos 3 genes seleccionados, puntualmente a las 12 y 24 h de exposición al estrés (Figura 10). Situación similar se observa en las muestras correspondientes a raíces, en especial para el gen 2 a las 12 y 24 h. Lo anterior indica, que estos genes actuarían de manera someramente distinta frente a exposiciones a NaCl 150 mM y Manitol 300mM, posiblemente presumiendo una reacción distinta en estos dos tipos de estrés, en especial para ITRG2, sin embargo la tasa de cambio es baja como para afirmar esta hipótesis con seguridad.

4.2. Obtención de las secuencias de interés para ser posteriormente transformadas en levaduras y expresar las proteínas codificadas por los marcos de lectura abiertos ITRG1, 2 y 3.

En el proceso de clonamiento, los mayores inconvenientes presentados se resolvieron optimizando y afinando los protocolos para cada uno de los genes. Es posible que los genes estudiados estuviesen expresándose en bajo número de copias, debido a que el tejido utilizado para extraer el mRNA proviene de plantas silvestres, cultivadas en condiciones normales, se realizó de esta forma debido a que no se tenía certeza de que alguna condición estimule la transcripción de estos genes. Lo anterior se relaciona con que es probable que genes implicados en el transporte iónico se expresen en mayor cantidad en condiciones estresantes, de

alta o baja salinidad o al someter las plantas a metales pesados (del Pozo et al., 2010).

El determinar los mejores promotores bajo los cuales estén los ITRG se relaciona con causar un efecto similar a lo que las plantas se ven enfrentadas en un momento de estrés iónico. Por lo tanto la alternativa más fisiológica habría sido contar con promotores inducibles por metales. Sin embargo, no contamos con las herramientas moleculares de forma rápida, en el laboratorio. Dentro de lo teníamos acceso, están los vectores de promotor inducible mediante galactosa y aquellos que poseen una expresión continua. Simulando el vector de promotor inducible un acercamiento más fisiológico y el vector de promotor de expresión continua un efecto más radical que dé señales del efecto de la acumulación de las proteínas codificadas por los ITRGs.

El estudio de la acumulación de proteínas ITRG causó bastantes dificultades. Típicamente esto se demuestra utilizando anticuerpos en experimentos de western blot. Según las construcciones realizadas en esta investigación, se pueden realizar western blot con 4 tipos de anticuerpos primarios. Las construcciones con el plasmidio pYES-DEST52 permiten realizar proteínas de fusión en el extremo C-terminal con un epítopo V5 y un dominio de 6 histidinas repetidas contiguas. En tanto que las construcciones realizadas con el vector pAG426GPD-ccdB-HA, otorgaban un epítopo de hemaglutinina (HA) en el C-terminal y los diseñados con pAG426GPD-ccdB-GFP, codificaban para una proteína fusionada en el extremo C-terminal, la proteína fluorescente verde aumentada (EGFP).

En la Figura 14, en la sección de resultados se observa que al realizar un western blot con el anticuerpo α V5 se muestra una banda de entre 30-33 kDa aproximadamente correspondiente a la masa molecular del producto proteico del

gen ITRG2 fusionado a lo epitopes de V5 e histidina de acuerdo a la estructura entregada por el plasmidio (31.5 kDa). También se observa una banda de un tamaño similar, superior a los 30 kDa que no correspondería al tamaño de la proteína de fusión esperada para pYES-ITRG3 (aproximadamente 23 kDa). No se logró determinar a que corresponde dicha banda. Mientras que para las levaduras transformadas con la construcción que posee ITRG 1 no se logró detectar una banda mediante este método. Tal vez esta proteína se expresa en una cantidad muy baja para la sensibilidad del método utilizado, otras posibles opciones se relacionan con el epitope, este puede haber sido cortado por la maquinaria molecular de las levaduras o puede haber sido transcrito o traducido de una manera incorrecta. Debido a que el producto génico de ITRG1 produce un efecto de tolerancia muchas veces similar al notado para ITRG1 y 2, la opción que mejor se explicaría lo ocurrido sería la relacionada con el corte y pérdida del epitope.

El que aparezcan bandas diferentes al tamaño al esperado, como en el caso de las levaduras transformadas con pYES-ITRG3, puede tener varias causas, una posible explicación es que la proteína no se termine de traducir donde se debe, es decir, el complejo ribosomal no distingue el codón de término y sigue traduciendo, hasta obtener un péptido que en este caso superó los 30 kDa.

Otra opción que explique este resultado, se relaciona con un posible mal plegamiento proteico, es decir que las proteínas se pliegan de forma incorrecta, el que exista una formación de dímeros o trímeros estables. Debido a que el tamaño mostrado no corresponde aproximadamente al doble o triple del peso molecular estimado para esta proteína, esta opción no resulta fácilmente plausible, al menos pensando en una adhesión a otro monómero de forma completa. Finalmente está la opción de que ocurra una asociación inestable del tipo secundaria o terciaria con

algún otro péptido, esta alternativa se descartaría, debido a que los experimentos se realizaron en condiciones denaturantes, por lo tanto cualquier posible interacción débil debería suprimirse, restando la posibilidad de alguna unión de naturaleza covalente, lo que implicaría la presencia de alguna función celular paralela que actúe en el proceso.

Mediante microscopía confocal se observó la acumulación de la proteína EGFP, lo cual sugiere que las proteínas fusionadas con EGFP se estarían acumulando (Figura 15). Originalmente, los 3 ITRGs escogidos son codificados en el núcleo de las células de *A. thaliana*, por lo tanto, lo esperado es que las proteínas estén codificadas y sean transcritas en el núcleo de las levaduras, además de ser traducidas en el citoplasma para después ser translocadas a la mitocondria. Se sabe que sólo entre un 0.1 y 1 % de las proteínas mitocondriales son codificadas en la mitocondria, las demás proteínas son codificadas en el núcleo (Pavel y col, 2006). Las proteínas fusionadas a EGFP codificadas por el ORF ITRG1 e ITRG3 se localizarían en el citoplasma, debido a que las levaduras transformadas con el vector sin inserto no muestran fluorescencia, se asume que para percibir fluorescencia, debe haber alguna secuencia de DNA con un marco de lectura abierto que permita la traducción de EGFP, lo que no se observa en los controles, respaldando este argumento. Junto con lo anterior, la fluorescencia mostrada por las levaduras transformadas con una construcción que posee una localización similar a la observada para las transformantes con ITRG1, al fusionarse con EGFP –cepa W303 de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el vector pGPD414-, indica una localización citoplasmática (Kim et al., 2002).

La proteína de fusión codificada por el ORF ITRG2, se estaría acumulando en el citoplasma y posiblemente en la membrana plasmática. Esto se determinó al

comparar los resultados obtenidos, con los reportados al registrar la ubicación subcelular de la proteína integral de membrana Mrh1p, fusionada a EGFP en *Saccharomyces cerevisiae* (Bircham et al., 2011). Además como comparación, el patrón observado en las levaduras transformadas con el vector que posee el ORF de ITRG2, es diferente al descrito en levaduras para las proteínas de mitocondrias MsrB y de citoplasma MsrA, ambas involucradas en la regulación del funcionamiento mitocondrial, pero de ubicaciones distintas en la célula (Kaya et al., 2010).

Debido a que en plantas se predijo que en los productos proteicos codificados por los 3 ITRG se localizan en mitocondria, en futuros análisis convendría realizar una colocalización con un marcador de mitocondria como MitoRed que se acumula selectivamente en la membrana de la mitocondria con respiración activa, en una manera dependiente de potencial , incluso pudiendo separar las células que presentan una respiración celular de las que no (Kaya y col., 2010). De esta forma, poder descartar definitivamente que se trate de una localización en mitocondria.

4.3. Evaluación de la tolerancia de levaduras *S. cerevisiae* transformadas con las construcciones realizadas que poseen los ORF de ITRG1, ITRG2 y ITRG3.

Los experimentos realizados en esta fase de la investigación, tienen por objetivo determinar si existe una variación en el crecimiento de levaduras transformadas con las distintas construcciones que poseen los ITRG, en comparación con las levaduras transformadas con los vectores de expresión sin insertos. El diseño experimental, busca dilucidar si la transformación de los ORF de los distintos ITRG en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, produce tolerancia a distintos cationes metálicos por separado en solución. Otra opción válida posible, es que los genes no

causen efecto alguno, encontrando fenotipos similares a los controles o lo contrario a la primera alternativa, es decir que la transformación de estos genes de *Arabidopsis* provoque una sensibilidad en las levaduras frente a los distintos cationes metálicos. Con estos resultados entonces, se pudo determinar si la transformación de los genes produce un efecto particular, metal específico o más bien global, de amplio espectro.

Según los resultados obtenidos, se observó que dependiendo de los tipos de construcciones los niveles de tolerancia para las levaduras transformadas eran diferentes por cada ORF de ITRG, lo cual se detalla a continuación.

Se debe contemplar que para realizar estos experimentos, se empleó un método de estrés en concentraciones determinadas, modificando espontáneamente una concentración mínima o traza de los metales en el medio a una alta concentración. Es decir, las levaduras no sufrieron algún periodo de aclimatación o estrés gradual, el cual podría contribuir a una mejor respuesta del cultivo. A un acostumbramiento paulatino al metal expuesto, en este caso se mide entonces, una respuesta inmediata al estrés.

Según los resultados de tolerancia en los distintos sistemas utilizados para expresar el ORF del gen ITRG1, se trataría de un gen que en condiciones inducibles de expresión es capaz de generar tolerancia a un amplio espectro de metales. Observándose diferencias significativas para varios metales (Sodio, Zinc, Cobalto y Cadmio) con respecto a los controles, alcanzando a observar diferencias de hasta cuatro veces en comparación con el crecimiento registrado por aquellas levaduras transformadas con el vector sin inserto. Sin embargo, al ser comandado por un promotor constitutivo, se invierte el efecto casi completamente para las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG1-HA, haciéndose más

sensibles a los metales. Con la construcción que posee un promotor constitutivo y una proteína de fusión con EGFP, se ve un efecto intermedio, gradual de acuerdo a las concentraciones, logrando tolerar levemente bajas concentraciones de algunos de los metales como cobalto, cobre y cadmio. Por lo tanto, la proteína codificada por el ORF ITRG1 expresada de manera inducible, de manera gradual, en vez de una expresión continua, logra hacer a las levaduras más tolerantes.

En las transformaciones realizadas con pYES-ITRG2, se pudo distinguir que en tratamientos realizados con Na^+ , Zn^{2+} y Cd^{2+} las levaduras son más tolerantes que los controles para prácticamente todas las concentraciones evaluadas, mientras que para las incubaciones hechas con Co^{2+} y Cu^{2+} , las curvas de crecimiento sólo muestran diferencias para las concentraciones menores de cada metal, en tanto para las otras concentraciones no permiten determinar un comportamiento diferencial, comportándose de manera similar a los controles. En las levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG2-GFP, se observó que en incubaciones con Na^+ , Co^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} crecen menos que las levaduras transformadas con el vector sin inserto. Mientras que singularmente, los experimentos realizados con Cd^{2+} , se observa un comportamiento dual en el tiempo, es decir, hasta las 12 h de incubación con este metal, las levaduras que poseen la construcción pAG426GPD-ITRG2-GFP registran un crecimiento mayor que las transformadas con el vector sin inserto, luego de esto, se invierten las curvas, describiendo mayor sensibilidad que el control a Cd^{2+} .

Los resultados observados para las transformaciones realizadas con ITRG2, en los dos sistemas utilizados, indican que este gen podría otorgar resistencia en una forma más acotada que el gen ITRG1, sólo proporcionando tolerancia frente a cationes de Sodio, Zinc y Cadmio.

Al analizar el crecimiento de las levaduras transformadas con pYES-ITRG3, se observó que son más tolerantes en general que las controles en tratamientos con Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} . Mostrando un comportamiento similar para Sodio y Cobre. Mientras que las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG3-HA muestran una mayor tolerancia que las levaduras controles, al ser sometidas a tratamientos con Na^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} en las concentraciones menores, contrario al crecimiento registrado para los tratamientos con cadmio, donde las levaduras que poseen el ORF para ITRG3 fusionado al epítopo HA se muestran más sensibles que las levaduras transformadas con el vector sin inserto.

Los resultados obtenidos para las levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG3-GFP, indican que son más sensibles con respecto a las levaduras control para Na^+ , Co^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} .

En tanto, de modo semejante a lo que ocurre con las levaduras transformadas con la construcción pAG426GPD-ITRG2-GFP, en los resultados obtenidos para las levaduras transformadas con pAG426GPD-ITRG3-GFP en los tratamientos de Cd^{2+} , también se percibe un comportamiento dual en el tiempo, hasta las 12 h de incubación con el metal, observándose un crecimiento mayor que en las levaduras transformadas con el vector sin inserto. Invirtiéndose las curvas posteriormente, describiendo mayor sensibilidad que el control a cadmio. De acuerdo a los resultados obtenidos para las distintas transformaciones realizadas con el ORF de ITRG3, esta transformación sería capaz de inducir una tolerancia selectiva sólo a 3 cationes, como lo son el Sodio, Zinc y Cobre.

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que un transgen puede producir baja en el ritmo de crecimiento, cambios en el rendimiento de biomasa y cambios en la capacidad respiratoria. Donde los efectos son asociados con la toxicidad de

las proteínas, la dilución de las proteínas (efecto de aglomeración dentro de la célula), el efecto del mismo DNA durante la replicación y finalmente asignación de recursos celulares para la replicación (Contador et al., 2011). Este tipo de efectos pueden ser los causantes de los comportamientos observados cuando se emplearon promotores de expresión constitutiva, por ende las levaduras que poseen los ITRGs se observan más sensibles que las controles

En otras levaduras como *Pichia pastoris*, el aumentar el número de genes foráneos puede causar en algunas oportunidades influencias negativas en la fisiología normal de las células transformantes. Específicamente en la caso de la expresión de proteínas secretorias que incluyen una capacidad reducida del consumo de etanol y un rango de crecimientos específico. También una baja en la viabilidad celular, aumento de la inestabilidad del gen foráneo integrado o disminución de la habilidad secretoria. Por lo tanto, los beneficios de aumentar el dosaje génico puede producir unas condición fisiológica-celular deteriorada como resultado de la sobreexpresión de proteínas, lo que es generalmente conocido como “*burden effect*” o efecto de carga (Zhu et al., 2011).

Esto también ocurre en células animales (Kwon et al., 2011), al ser las levaduras eucariontes, puede ocurrir un efecto similar. Por lo tanto de emplearse estos genes en algún proceso productivo, se debería analizar el uso de distintos promotores a los utilizados experimentalmente en esta investigación.

Otra posible causa hace relación con la función de la proteína que se esté acumulando, la ubicación subcelular de las proteínas acumuladas sería citoplasmática (ITRG1 y ITRG3) o en la membrana (ITRG2), por lo tanto un

desequilibrio constante en la célula, inducido por su función podría afectar negativamente el crecimiento y reproducción de ella.

La función misma que podrían estar desarrollando las proteínas codificadas por los ITRG en levadura no está determinada, sin embargo, somos capaces de observar que les permite ser más tolerantes a las concentraciones de los metales utilizados. Debido a que los tres genes poseen anotaciones relacionados con bioenergética celular hace relación con que, al expresarse bajo el dominio de un promotor constitutivo se haya demostrado que produce cambios en la capacidad respiratoria de las células. Mientras que si existe un aumento controlado y leve de los transcritos relacionados con respiración celular, seguramente permiten una mejora en los procesos bioenergéticos, lo que podría ser responsable del aumento de la tolerancia de las levaduras al utilizar las construcciones realizadas con pYES.

Los ORFs ITRG1, ITRG2 y ITRG3 poseen gran potencial para ser utilizados como herramientas moleculares para inducir tolerancia frente a estrés salino, lo cual demostró su capacidad para tolerar ciertas concentraciones de metales. Sin embargo, según los experimentos realizados, esto ocurre sólo bajo un promotor inducible, lo cual es más cercano a lo que normalmente ocurriría frente a un estrés. Los mejores candidatos de los tres genes estudiados, son el ITRG1 y el ITRG3, debido a que son capaces de inducir tolerancia a un rango mayor de metales, lo que puede ser de gran utilidad en donde haya una presencia de múltiples cationes metálicos. Para complementar esta investigación, sería de gran utilidad realizar estudios de mutagénesis sitio-dirigidas en los genes, como una estrategia para aumentar el rango de tolerancia que pueden otorgar a los organismos en que es transformada. Otra estrategia interesante para realizar en el futuro, es efectuar la clonación de los 3 genes en un mismo plasmidio, con las respectivas secuencias

promotoras y determinar si es posible observar efectos sinérgicos en los efectos de los tres ORF transformados en levaduras o en otros organismos de interés.

CONCLUSIONES

Utilizando la red de coexpresión génica desarrollada por el Dr. Alexander Vergara, donde se empleó como etiqueta molecular de propagación transporte iónico, se obtuvo una lista de doce genes con alta probabilidad de estar involucrados en transporte iónico, los ITRG. De estos doce genes, se seleccionaron tres genes, de acuerdo a estudios bibliográficos. Estos tres genes poseen como característica común una anotación en el GO relacionada con respiración celular, lo cual podría estar relacionado con el transporte iónico.

Se realizaron las construcciones moleculares que permiten la expresión de los tres ITRG seleccionados en levaduras. Se transformaron en *S. cerevisiae*. Se realizaron diferentes tipos de construcciones para evaluar la expresión de los genes en diferentes contextos genéticos. Se logró comprobar la expresión de ITRG2, bajo el promotor inducible por galactosa, mediante western blot. Además de evidenciar la acumulación de los productos protéicos de los tres ITRG fusionados con EGFP mediante microscopía confocal.

Se determinó la tolerancia de levaduras transformadas con las diferentes construcciones realizadas, frente a NaCl, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CuSO_4$ y $CoSO_4$ en diferentes concentraciones.

Se determinó que la expresión de los ITRG comandada por el promotor inducible por galactosa en levaduras provoca, en general más tolerancia a los metales evaluados. Siendo ITRG1 y 3 los que presentan mayores diferencias significativas en el crecimiento de las levaduras frente al control, en la mayoría de los metales. Sin embargo ITRG2, empleando el mismo promotor igualmente presenta aumento de tolerancia. Por lo tanto, sería probable y recomendable el uso de estos tres

genes bajo un promotor inducible para producir tolerancia, al menos frente a los metales evaluados.

Las dos construcciones obtenidas con la etiqueta HA – ORF de ITRG1 y 3- inducen sensibilidad en las levaduras transformadas frente a los metales evaluados.

La transformación de levaduras con la construcción pAG426GPD-ITRG1-GFP induce una mayor tolerancia que las levaduras controles sólo en las concentraciones más bajas de los metales evaluados, mientras que para las más altas, se hacen más sensibles. Mientras que las construcciones realizadas con ITRG 2 y ITRG 3, comandadas bajo el promotor 426GPD y fusionadas con EGFP inducen sensibilidad a las levaduras para Na^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} .

Con los resultados expuestos se demuestra que los tres ITRGs evaluados tendrían funciones relacionadas con la homeostásis iónica, por ende, con el transporte iónico. Dependiendo del promotor utilizado para la expresión de los ITRG son los distintos niveles de tolerancia/sensibilidad otorgada a las levaduras transformadas.

REFERENCIAS

- Abogadallah GM, Nada RM, Malinowski R, Quick P** (2011) Overexpression of HARDY, an AP2/ERF gene from Arabidopsis, improves drought and salt tolerance by reducing transpiration and sodium uptake in transgenic *Trifolium alexandrinum* L. *Planta* **233**: 1265–76
- Agoramoorthy G, Chen F-A, Hsu MJ** (2008) Threat of heavy metal pollution in halophytic and mangrove plants of Tamil Nadu, India. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **155**: 320–6
- Aoki K, Ogata Y, Shibata D** (2007) Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. *Plant & cell physiology* **48**: 381–90
- Arsenault PR, Wobbe KK, Weathers PJ** (2008) Recent advances in artemisinin production through heterologous expression. *Current medicinal chemistry* **15**: 2886–96
- Barriuso J, Ramos Solano B, Fray RG, Cámara M, Hartmann A, Gutiérrez Mañero FJ** (2008) Transgenic tomato plants alter quorum sensing in plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant biotechnology journal* **6**: 442–52
- Belyaeva E a** (2010) Mitochondrial respiratory chain inhibitors modulate the metal-induced inner mitochondrial membrane permeabilization. *Acta biochimica Polonica* **57**: 435–41
- Belyaeva E a, Korotkov SM, Saris N-E** (2011) In vitro modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: a comparison of copper and mercury with cadmium. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* **25 Suppl 1**: S63–73
- Berardini TZ, Mundodi S, Reiser L, Huala E, Garcia-Hernandez M, Zhang P, Mueller LA, Yoon J, Doyle A, Lander G, et al** (2004) Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant physiology* **135**: 745–55
- Bhasin M, Raghava GPS** (2004) ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. *Nucleic acids research* **32**: W414–9
- Bircham PW, Maass DR, Roberts C a, Kiew PY, Low YS, Yegambaram M, Matthews J, Jack C a, Atkinson PH** (2011) Secretory pathway genes assessed by high-throughput microscopy and synthetic genetic array analysis. *Molecular bioSystems*.doi: 10.1039/c1mb05175j

- Brady S, Shatkay H** (2008) EpiLoc: a (working) text-based system for predicting protein subcellular location. Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing **615**: 604–15
- Briesemeister S, Blum T, Brady S, Lam Y, Kohlbacher O, Shatkay H** (2009) SherLoc2: a high-accuracy hybrid method for predicting subcellular localization of proteins. Journal of proteome research **8**: 5363–6
- Briesemeister S, Rahnenführer J, Kohlbacher O** (2010) Going from where to why--interpretable prediction of protein subcellular localization. Bioinformatics (Oxford, England) **26**: 1232–8
- de Champdoré M, Staiano M, Rossi M, D'Auria S** (2007) Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society **4**: 183–91
- Chou K-C, Shen H-B** (2010) Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. PloS one **5**: e11335
- Cohen B a, Mitra RD, Hughes JD, Church GM** (2000) A computational analysis of whole-genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. Nature genetics **26**: 183–6
- Colmer TD, Greenway H** (2011) Ion transport in seminal and adventitious roots of cereals during O₂ deficiency. Journal of experimental botany **62**: 39–57
- Contador CA, Andrews BA, Liao JC, Asenjo JA** (2011) Identification of Transcription Factors Perturbed by the Synthesis of High Levels of a Foreign Protein in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Systems Biology.doi: 10.1002/btpr.616
- Coulibaly I, Page GP** (2008) Bioinformatic Tools for Inferring Functional Information from Plant Microarray Data II: Analysis Beyond Single Gene. International journal of plant genomics **2008**: 893941
- Craigon DJ, James N, Okyere J, Higgins J, Jotham J, May S** (2004) NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. Nucleic acids research **32**: D575–7
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D** (2010) The language of calcium signaling. Annual review of plant biology **61**: 593–620
- Draghici S** (2002) Statistical intelligence: effective analysis of high-density microarray data. Drug discovery today **7**: S55–63
- Fleige S, Pfaffl MW** (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Molecular aspects of medicine **27**: 126–39
- De Freitas J, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T, Vulpe C** (2003) Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine **16**: 185–97
- Gene T, Consortium O** (2000) Gene Ontology : tool for the. Gene Expression **25**: 25–29

- Gibeaut D** (1997) Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiology* **115**: 317–319
- Heazlewood JL, Tonti-filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH** (2004) Experimental Analysis of the *Arabidopsis* Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components , Provides Assessment of Targeting Prediction Programs , and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins A novel insight into *Arabidopsis* mi. *Society* **16**: 241–256
- Horan K, Jang C, Bailey-Serres J, Mittler R, Shelton C, Harper JF, Zhu J-K, Cushman JC, Gollery M, Girke T** (2008) Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. *Plant physiology* **147**: 41–57
- Horton P, Park K-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K** (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research* **35**: W585–7
- Huang G-T, Ma S-L, Bai L-P, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo Z-F** (2011) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular biology reports*.doi: 10.1007/s11033-011-0823-1
- Irizarry R a.** (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Research* **31**: 15e–15
- Ivanova L a., Ronzhina D a., Ivanov L a., Stroukova LV, Peuke a. D, Rennenberg H** (2011) Over-expression of *gsh1* in the cytosol affects the photosynthetic apparatus and improves the performance of transgenic poplars on heavy metal-contaminated soil. *Plant Biology* **13**: no–no
- Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK** (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of genetics* **85**: 237–54
- Jomova K, Valko M** (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**: 65–87
- Kapardar RK, Ranjan R, Grover A, Puri M, Sharma R** (2010) Identification and characterization of genes conferring salt tolerance to *Escherichia coli* from pond water metagenome. *Bioresource technology* **101**: 3917–24
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology* **17**: 287–91
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant cell* **13**: 889–905
- Kaya A, Koc A, Lee BC, Fomenko DE, Rederstorff M, Krol A, Lescure A, Gladyshev VN** (2010) Compartmentalization and regulation of mitochondrial function by methionine sulfoxide reductases in yeast. *Biochemistry* **49**: 8618–25
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K** (2007) The AtGenExpress global stress expression data

set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **50**: 347–63

- Kim CS, Woo Y, Clore AM, Burnett RJ, Carneiro NP, Larkins BA** (2002) Zein Protein Interactions , Rather Than the Asymmetric Distribution of Zein mRNAs on Endoplasmic Reticulum Membranes , Influence Protein Body Formation in Maize Endosperm. *Society* **14**: 655–672
- Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK** (2010) Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **86**: 900–913
- Kourie JI** (1998) Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *The American journal of physiology* **275**: C1–24
- Kwon MS, Koo BC, Roh JY, Kim M, Kim J-H, Kim T** (2011) Production of transgenic chickens expressing a tetracycline-inducible GFP gene. *Biochemical and biophysical research communications* **410**: 890–4
- Lercher MJ, Blumenthal T, Hurst LD** (2003) Coexpression of neighboring genes in *Caenorhabditis elegans* is mostly due to operons and duplicate genes. *Genome research* **13**: 238–43
- Lercher MJ, Urrutia AO, Hurst LD** (2002) Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nature genetics* **31**: 180–3
- Liu S, Cheng Y, Zhang X, Guan Q, Nishiuchi S, Hase K, Takano T** (2007) Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa*. L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant molecular biology* **64**: 49–58
- Mahajan S, Pandey GK, Tuteja N** (2008) Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of biochemistry and biophysics* **471**: 146–58
- Mallia AK, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Olson BJ, Klenk DC, Company PC** (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid '. **85**: 76–85
- Masuda T** (2008) Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls. *Photosynthesis research* **96**: 121–43
- Mena NP, Bulteau AL, Salazar J, Hirsch EC, Núñez MT** (2011) Effect of mitochondrial complex I inhibition on Fe-S cluster protein activity. *Biochemical and biophysical research communications* **409**: 241–6
- Millar AH, Sweetlove LJ, Giege P, Leaver CJ** (2001) Analysis of the *Arabidopsis* Mitochondrial Proteome 1. *Society* **127**: 1711–1727
- Mitra SK, Gantt J a, Ruby JF, Clouse SD, Goshe MB** (2007) Membrane proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* using alternative solubilization techniques. *Journal of proteome research* **6**: 1933–50

- Mochida K, Uehara-Yamaguchi Y, Yoshida T, Sakurai T, Shinozaki K** (2011) Global landscape of a co-expressed gene network in barley and its application to gene discovery in triticeae crops. *Plant & cell physiology* **52**: 785–803
- Munns R** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment* **25**: 239–250
- Obayashi T, Hayashi S, Shibaoka M, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K** (2008) COXPRESdb: a database of coexpressed gene networks in mammals. *Nucleic acids research* **36**: D77–82
- Obayashi T, Kinoshita K, Nakai K, Shibaoka M, Hayashi S, Saeki M, Shibata D, Saito K, Ohta H** (2007) ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis. *Nucleic acids research* **35**: D863–9
- Persson S, Wei H, Milne J, Page GP, Somerville CR** (2005) Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8633–8
- Phang T-H, Shao G, Lam H-M** (2008) Salt tolerance in soybean. *Journal of integrative plant biology* **50**: 1196–212
- del Pozo T, Cambiazo V, González M** (2010) Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Biochemical and biophysical research communications* **393**: 248–52
- Prashanth SR, Sadhasivam V, Parida A** (2008) Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant Avicennia marina in indica rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. *Transgenic research* **17**: 281–91
- Quackenbush J** (2003) Genomics. Microarrays--guilt by association. *Science (New York, NY)* **302**: 240–1
- Rea SL, Graham BH, Nakamaru-Ogiso E, Kar A, Falk MJ** (2010) Bacteria, yeast, worms, and flies: exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Developmental disabilities research reviews* **16**: 200–18
- Ren X, Fiers MWEJ, Stiekema WJ, Nap J** (2005) Local Coexpression Domains of Two to Four Genes in the Genome of Arabidopsis 1 [w]. *Society* **138**: 923–934
- Serrano R, Rodriguez-Navarro a** (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current opinion in cell biology* **13**: 399–404
- Sharan R, Ulitsky I, Shamir R** (2007) Network-based prediction of protein function. *Molecular systems biology* **3**: 88
- Silver S, Phung LT** (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **32**: 587–605

- Spellman PT, Rubin GM** (2002) of Biology BioMed Central Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *Journal of Biology* 1–8
- Sun J, Chen S-L, Dai S-X, Wang R-G, Li N-Y, Shen X, Zhou X-Y, Lu C-F, Zheng X-J, Hu Z-M, et al** (2009) Ion flux profiles and plant ion homeostasis control under salt stress. *Plant signaling & behavior* 4: 261–4
- Tehseen M, Cairns N, Sherson S, Cobbett CS** (2010) Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics : integrated biometal science* 2: 556–64
- Tuteja N** (2010) Helicases. *Methods in Molecular Biology* 587: 377–387
- Vinocur B, Altman A** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology* 16: 123–32
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1–14
- Wang Z, Huang B** (1982) Physiological Recovery of Kentucky Bluegrass from Simultaneous. 1729–1736
- Wienkoop S, Baginsky S, Weckwerth W** (2010) *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research. *Journal of proteomics* 73: 2239–48
- Williams EJB, Bowles DJ** (2004a) Coexpression of Neighboring Genes in the Genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* 1060–1067
- Williams EJB, Bowles DJ** (2004b) Coexpression of neighboring genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genome research* 14: 1060–7
- Yang J, Wang Y, Liu G, Yang C, Li C** (2010) *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd(2+), Zn (2+), Cu (2+), and NaCl in transgenic yeast. *Molecular biology reports*.doi: 10.1007/s11033-010-0265-1
- Yuan Z, Mattick JS, Teasdale RD** (2004) SVMtm: support vector machines to predict transmembrane segments. *Journal of computational chemistry* 25: 632–6
- Zhang L, Xing D** (2008) Rapid determination of the damage to photosynthesis caused by salt and osmotic stresses using delayed fluorescence of chloroplasts. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 7: 352–60
- Zhu J** (2000) Update on Stress Signaling Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using *Arabidopsis*. *Society* 124: 941–948
- Zhu J-K** (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66–71
- Zhu T, Guo M, Zhuang Y** (2011) Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes. *Applied Microbiology* 1127–1135

Zimble DL, Penwell WF, Gaddy J a, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL, Actis L a
(2009) Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **22**: 23–32