

UCH-FC
Biotecnología
M445
C.A.



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Universidad de Chile

Silenciamiento inducible de *hma1* como sistema para estudiar su rol en la homeostasis de Calcio

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Daniel Maturana Middleton

Julio, 2008
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Viviana Ordenes O.
Profesor patrocinante: Dra. Cecilia Vergara M.



“SILENCIAMIENTO INDUCIBLE DE *hmal* COMO SISTEMA PARA ESTUDIAR SU ROL EN LA HOMEOSTASIS DE CALCIO”

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

DANIEL MATURANA MIDDLETON

Dra. Viviana Ordenes Ortíz
Directora Seminario de Título

Dra., Cecilia Vergara Montecino

C. Vergara M.



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange
Correctora

Santiago de Chile, 25/7 2008







Índice

Índice.....	I
Índice de Figuras.....	V
Lista de abreviaturas.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introducción	1
1.1 Inhibición de los transportadores de calcio por thapsigargina.....	6
1.2 Transportadores de metales pesados (HMAs).....	7
1.3 Estrategia de estudio del transporte de Ca ²⁺	9
1.4 RNA interferencia	10
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo General.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 Materiales y métodos	14
3.1 Equipos	14
3.2 Reactivos y enzimas.....	14
3.3 Antibióticos.....	14
3.4 Mezcla de tierra utilizada para el cultivo de plantas.....	15
3.5 Material vegetal	15
3.6 Cepas bacterianas.....	16

3.7	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	16
3.8	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	16
3.9	Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101.....	17
3.10	Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101.....	17
3.11	Material Plasmidial	17
3.12	Oligonucleotidos	20
3.13	Medios de cultivo.....	21
3.13.1	<i>Cultivos bacterianos</i>	21
3.14	Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	21
3.15	Purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa.....	21
3.16	Digestión de ADN mediante enzimas de restricción	21
3.17	Ligación de fragmentos de ADN	22
3.18	Purificación de ADN plasmidial	22
3.19	Purificación de productos de PCR	22
3.20	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
3.21	RT-PCR.....	23
3.22	PCR traslapado.....	23
3.23	Diseño de los partidores de ADN utilizados en las reacciones de PCR traslapado.	24
3.24	Partidores para fusión INDR:.....	25
3.25	Construcción del RNAi para hma1.....	27
3.26	Subclonamiento de IZ y INDR en el vector pGEM [®] -T.....	30
3.27	Corte del constructos INDR desde pGEM [®] -T y ligación al vector pGEM [®] -IZ.....	31

3.28	Transformación genética estable de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3.29	Inducción del silenciamiento en placas.....	32
3.30	Fraccionamiento subcelular de <i>A. thaliana</i>	32
3.31	Determinación de proteínas en fracciones subcelulares	33
3.32	Aislamiento de protoplastos desde <i>A. thaliana</i>	33
3.33	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes	34
3.34	Medición de los niveles de calcio en plántulas de <i>A. thaliana</i>	35
3.35	Medición de los niveles de Calcio en protoplastos de meristema de <i>A.thaliana</i>	35
3.36	Calibración de los registros de luminiscencia en concentraciones de Ca^{2+}	36
4	Resultados	37
4.1	Aislamiento de secuencias y clonamiento en el vector pGEM-T [®]	37
4.1.1	<i>Amplificación del fragmento de hma1 antisentido (DR)</i>	37
4.1.2	<i>Amplificación del intrón de la actina 11 desde ADN genómico</i>	38
4.1.3	<i>Fusión del intrón y el fragmento de hma1 antisentido (DR)</i>	39
4.1.4	<i>Clonamiento en pGEM-T[®] del fragmento IZ y del fragmento INDR</i>	40
4.2	Subclonamiento del fragmento INDR en pGEM-T [®] -IZ y generación del vector binario pER8-IZINDR.....	41
4.2.1	<i>Subclonamiento del fragmento INDR en pGEM-T[®]-IZ</i>	41
4.2.2	<i>Subclonamiento en el vector binario pER8</i>	42
4.3	Transformación de <i>A. thaliana</i> con el vector binario pER8-IZINDR.....	43
4.4	Comprobación de plantas transgénicas.....	45
4.5	Comprobación del silenciamiento en las plantas transgénicas.	46
4.6	Análisis expresión de hma1 en diferentes tejidos	47

4.7	Topología de la apoproteína Aequerina en el aparato de Golgi.....	48
4.8	Análisis de la fluctuación en la concentración de Calcio.....	49
5	Discusión	53
5.1	RNA interferencia para hma1	54
5.2	Silenciamiento de HMA1.	55
5.3	Expresión de HMA1 en diferentes tejidos de <i>A. thaliana</i>	57
5.4	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
5.5	Aequerina en el aparato de Golgi.	58
5.6	Fluctuaciones en la concentración de Calcio.	59
6	Conclusiones	61
7	Proyecciones y trabajo futuro	62
8	Bibliografía	63



Índice de Figuras



Figura 1. Árbol no enraizado obtenido del alineamiento de secuencias de las ATPasas tipo-P.....	4
Figura 2. Esquema de las proteínas SERCA de mamíferos y la proteína HMA1 de <i>A. thaliana</i>. ...	5
Figura 3. Esquema de los estados presentes en el ciclo de transporte de calcio por las ATPasas tipo P.....	6
Figura 4. Mecanismo de luminiscencia de la apoproteína Aequorina.	9
Figura 5 . Mecanismo de silenciamiento mediado por RNA interferencia.....	11
Figura 6. Mapa del Vector pER8.....	18
Figura 7. Mapa del vector pGEM®-T.....	19
Figura 8. Fusión de las secuencias intrón y hma1(DR) usando extensión por PCR traslapado..	24
Figura 9. Partidores para la amplificación del intrón con “cola” de DR.	26
Figura 10. Partidores para la amplificación de DR (hma1 antisentido) con “punta” del intrón.	27
Figura 11. Estrategia de clonación del constructo silenciador.....	29
Figura 12. Vector binario Per8-IZINDR.....	30
Figura 13. Fotografía de protoplasto obtenido.....	34
Figura 14. Amplificación del fragmento DR.....	38
Figura 15. Amplificación del intrón.	39
Figura 16. Fusión del intrón (IN) con el fragmento antisentido de <i>hma1</i> (DR).....	40

Figura 17. Digestión con enzimas de restricción y amplificación del fragmento INDR e IZ	41
Figura 18. Digestión del vector pGEM-T-IZINDR.....	42
Figura 19. Comprobación del vector pER8-IZINDR por digestión con enzimas de restricción..	43
Figura 20. Selección de plantas resistentes a hygromicina.....	44
Figura 21. Amplificación del gen que confiere la resistencia a hygromicina en plantas seleccionadas como transgénicas.....	45
Figura 22. Comprobación de silenciamiento obtenido en plantas inducidas.....	47
Figura 23. Expresión diferencial de hma1 en distintos tejidos de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	48
Figura 24. Western blot con anticuerpos monoclonales específicos para la proteína aequorina en vesículas del aparato de Golgi.....	49
Figura 25. Variación en la concentración de Calcio citosólico característica en protoplastos frente a un estímulo frío.....	51
Figura 26. Variación en la concentración de Calcio del Golgi en protoplastos característica de <i>A. thaliana</i> frente a un estímulo frío.....	52



Lista de abreviaturas.

ADN	Ácido desoxiribonucleótido
ADNc	ADN complementario
Aq	Proteína bioluminiscente Aequorina
BrEt	Bromuro de etidio
D.O.	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleótidos fosfato
DR	Fragmento del gen de hma1 en dirección antisentido
dT	Deoxi-Timidina
EDTA	Tetraacetato de etilendiamina
IN	Intrón del gen de la actina 11
IZ	Fragmento del gen de hma1 en dirección sentido
LB	medio Luria Bertani
mRNA	RNA mensajero
MS	Medio Murashige y Skoog
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAasas	Ribonucleasas
RNAi	RNA de interferencia
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
Taq	ADN Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Ácido tricloro acético
TE	Tampón Tris-HCl
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilen diamina
Tg	Thapsigargina

Resumen

El Calcio cumple un rol fundamental en ciertos mecanismos de señalización celular; frente a un estímulo, la concentración de calcio citosólico aumenta provocando una cascada de señalización la cual termina en una respuesta celular en distintos niveles.

El retículo endoplásmico y la vacuola son organelos que funcionan como reservorios de Calcio, los cuales frente a un estímulo liberan el calcio hacia el citosol. En células animales se ha descrito que el aparato de Golgi actúa de similar manera, sin embargo en células vegetales se ha visto que éste no actúa como un reservorio de calcio, sino que estaría actuando como un recolector de calcio, ayudando a restablecer los niveles basales.

En la membrana del aparato de Golgi se han descrito una serie de mecanismos de transporte, uno de los cuales es inhibible por el sesqui terpeno thapsigargina (inhibidor específico de SERCA ATPasas). Por estudios bioinformáticos el mejor candidato para poseer esta actividad es la proteína transportadora HMA1.

HMA1 se ha descrito como un transportador de metales pesados. Experimentos de expresión heteróloga en levaduras han demostrado que HMA1 es capaz de dar tolerancia a Cd^{+2} y de recuperar un fenotipo sensible a la falta de Ca^{+2} . Ensayos de transporte en estas levaduras indican que HMA1 es capaz de transportar calcio y que este es inhibido por thapsigargina.

Esta tesis se enfocó en el desarrollo de un sistema para el estudio de HMA1 en *Arabidopsis thaliana* y su papel en la homeostasis de calcio, mediante el silenciamiento del gen que codifica para dicha proteína. Para esto se diseñó, generó y clonó un RNA interferencia inducible para *hmal*, el cual consistió de una secuencia de 365 pb del gen de *hmal* en dirección sentido, seguido del tercer intrón del gen de la actina 11 y finalizado con la misma secuencia de *hmal* en dirección antisentido. Este constructo se dejó bajo el control de un promotor incompleto, el cual necesita de la unión de un activador transcripcional para su activación. Dicho activador está codificado en el vector y es inducible por estradiol.

Se transformaron 3 líneas de *A. thaliana* con el RNA interferencia. La primera es una línea "wildtype". La segunda es una línea que expresa la proteína lumicente Aequorina libre en el citosol (Aeqcit) y la tercera línea expresa Aequorina destinada al aparato de Golgi (Aeqgol). La transformación fue comprobada por PCR para el gen de resistencia al antibiótico higromicina. Se identificaron 18 líneas transformantes para la línea "wildtype", 15 para la línea Aeqcit y 15 para la línea Aeqgol.

De las líneas transformadas, sólo se analizó el RNA interferencia en la línea "wildtype". En esta se observó el silenciamiento de *hmal* mediante geles de agarosa. Este silenciamiento fue confirmado posteriormente finalizada esta tesis, mediante RT-PCR de tiempo real.

Por otra parte, se estudiaron las variaciones de calcio frente a un estímulo abiótico como el frío. Se observó que las variaciones en la concentración de calcio citosólico producida al generar un estímulo de frío fue similar (en forma y amplitud de la espiga) en plantas completas y protoplastos, siendo esta última un poco más prolongada.

Las variaciones de calcio observadas en el aparato de Golgi concuerdan con lo visto en plántulas, las cuales se caracterizan por un aumento diferido (no ocurre en el mismo instante del estímulo) y el aumento es gradual demorando aproximadamente 10 minutos en llegar al nivel máximo.

Con esta caracterización de la respuesta de calcio en el citosol y en el aparato de Golgi, se compararán las respuestas de las plantas silentes en *hmal* para determinar el papel de este factor en la homeostasis de calcio.

Abstract

Calcium plays a fundamental role in some cell signaling processes; in response to a stimulus, the calcium concentration increases producing a signaling cascade which ends in a response.

The endoplasmic reticulum and the vacuole are organelles that function as calcium reservoirs, which liberate calcium to the cytosol in response to a stimulus. In animal cells, the Golgi apparatus has shown to act in a similar way, whereas in plant cells it acts as a calcium collector, helping to restore its basal levels.

Several transport mechanisms have been described in the Golgi apparatus, one of them being inhibited by thapsigargin. Bioinformatic studies have predicted this inhibitable transporter as the protein HMA1.

HMA1 has been previously described as a heavy metal transporter. Heterologous expression experiments have shown that HMA1 can grant Cd^{+2} tolerance and to recover a calcium sensitive phenotype. Transport assays in yeast, show that HMA1 is capable of transporting calcium and moreover, it is inhibitable by thapsigargin.

This thesis research focused on the development of a system to study HMA1 in *Arabidopsis thaliana* and its role in the calcium homeostasis, by the silencing of the gene that codifies for that protein. Thus, an inducible interference RNA for *hmal* was designed, generated and cloned, which consisted of 365 bp of the *hmal* gene in sense direction, followed by the third intron of the actin 11 gene y ended with the same sequence of *hmal* in the antisense direction. This construct was under control of an incomplete promoter, activated by a transcriptional activator that was codified in the vector. This transcriptional activator was inducible by estradiol.

Three *A. thaliana* lines were transformed with the interference RNA. The first one was the "wildtype", the second one expressed the luminescent protein Aequorin free in the cytosol (Aeqcit) and the third one expressed Aequorin destined to the Golgi apparatus (Aeqgol). The transformation was probed by PCR for the hygromycin antibiotic resistance gene. Eighteen lines were identified as transformants for the "wildtype", 15 for the Aeqcit line and 15 for the Aeqgol line.

Only the "wildtype" transformed line was further analyzed, and it showed that the interference RNA was capable of silencing the *hmal* gene, after inducing plants for 15 days with estradiol. On the other hand, calcium variations were analyzed in response to an abiotic stimulus. It was observed that after a cold stimulus, cytosolic calcium concentration variations were similar in complete plants and in protoplasts, being a little bit longer in the protoplasts. This variation was characterized by an instantaneous and sudden increase, followed by a gradual decrease until basal levels were achieved. The whole process lasted for about 10 minutes in protoplasts, while in plants it lasted for about 1 minute.

The observed calcium variations in the Golgi apparatus agree with the ones observed in plants which are characterized by a differed initial increase (it does not happen in the same instant of the stimulus) followed by a gradual increase, which takes about 10 minutes to reach the maximum level.

This characterization will be used to compare the signalling process in *hmal*-RNAi plants, and determine its role in calcium homeostasis.

1. Introducción

Los organismos vivos están sometidos a una amplia variedad de estímulos, los cuales pueden ser favorables (ej, hormonas, reproducción) o adversos (sequía, parásitos, frío, etc) para su desarrollo y crecimiento. Los estímulos adversos producen stress, por lo que son evitados mediante escape o evasión, es decir se mueven. Sin embargo, las plantas que son organismos césiles, no pueden alejarse para “escapar” del ambiente adverso, y han desarrollado mecanismos de reconocimiento y tolerancia a ellos. Estos mecanismos, involucran procesos de señalización por los cuales la señal externa se transduce, lo que a su vez desencadena una serie de procesos y respuestas fisio-moleculares dentro del organismo (Zhu J., 2002).

El calcio es un elemento ubicuo que actúa como segundo mensajero en la percepción, y señalización de estímulos ambientales y endógenos que provocan estrés, tanto en animales como en plantas. Se ha determinado, que en general la primera respuesta ante un estímulo es el aumento de la concentración de Calcio en el citosol y se postula que no solo el aumento, sino que también la cinética y la localización subcelular del cambio de la concentración de calcio determinan la especificidad de la señal. (Xiong y col., 2006; McAnish y col., 1998; Hetherington y col., 2004; Cobbett y col., 2003; Trewavas, 2004).

En células no estimuladas, existe un nivel de calcio citosólico libre considerado basal o “rest”. Este nivel basal varía entre 300 y 600 nM en plantas, lo que es una concentración muy baja en comparación con el calcio total presente en los tejidos, el cual varía entre 1-10 mM (White y col., 2003). El bajo nivel basal de Ca^{2+} citosólico en células no estimuladas es esencial para la señalización intracelular mediada por este, y es mantenido principalmente por el transporte de Ca^{2+} desde el citosol hacia el espacio extracelular o hacia el lumen de organelos, los que actúan como reservorios, como la vacuola, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y principalmente la pared celular (Sanders y col.,

2002). Este nivel citosólico de calcio, aumenta considerablemente en respuesta a estímulos, ya sea mediante la apertura de canales de la membrana celular o por la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares (Logan y col., 2003; Hetherington y col., 2004; Alvarez y col., 2002). Estos aumentos transientes en la concentración de calcio citosólico gatillan la activación de un sin número de segundos mensajeros como: calmodulina, proteínas kinasas dependientes de calcio, y otras proteínas moduladas por Ca^{2+} , para producir una amplificación de la señal determinada para finalmente producir respuestas fisiológicas adaptativas.

Para poder ser nuevamente estimuladas, las células deben retornar a los niveles de "rest" transportando calcio en contra de su gradiente electroquímico. Para esto existen dos mecanismos de transporte activo descritos, estos son los intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ y las Ca^{2+} -ATPasas. Los intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, son un mecanismo activo secundario de transporte que utilizan la gradiente de protones para transportar calcio en contra de su gradiente electroquímico. Se encuentran principalmente en la membrana plasmática. Por otra parte, las Ca^{2+} -ATPasas, también llamadas bombas de calcio, son transportadores activos primarios de calcio y utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para transportar calcio en contra de su gradiente electroquímico, se encuentran en la membrana plasmática como también en la membrana de la vacuola (Axelsen y col., 2001), del retículo endoplásmico (Liang y col., 1998), del aparato de Golgi, de los cloroplastos, y de las mitocondrias (White y col., 2003). La afinidad de estos tipos de transporte por calcio es diferente: Las Ca^{2+} -ATPasas poseen afinidad mayor con K_m en el rango micromolar bajo ($K_m < \mu\text{M}$), mientras que los intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ poseen K_m en el rango micromolar alto ($K_m \geq \mu\text{M}$). Esto sugiere que cumplen distintos papeles en la mantención y reposición del nivel de reposo de la concentración de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rep}} < \mu\text{M}$). Por un lado los intercambiadores determinarían la remoción inicial de calcio después del estímulo, cuando la concentración es alta y se requiere de una disminución rápida, mientras

que las bombas actuarían después bajando y manteniendo la concentración de Calcio en niveles bajo el micromolar. Es por esto que las bombas de calcio tienen un papel indispensable en la fisiología celular.

En células vegetales, las bombas de calcio han sido ampliamente estudiadas. En general los estudios de actividad de estas bombas se han llevado a cabo mediante ensayos de complementación en levaduras mutantes y ensayos de captación de calcio radioactivo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) en fracciones enriquecidas de membranas de distintos organelos.

En *Arabidopsis thaliana*, estos estudios en conjunto con estudios bioinformáticos realizados con su genoma ya secuenciado, han resultado en la clasificación de estas bombas en dos grandes grupos (Geisler y col., 2000): bombas de calcio estimuladas por calmodulina y bombas de calcio no estimuladas por calmodulina.

1. **Bombas de calcio estimuladas por calmodulina:** Estas pertenecen a la subfamilia P_{2B} de las proteínas tipo P, la que está representado en *A. thaliana* por 10 proteínas (Figura 1). La característica principal es que poseen un motivo auto inhibitorio que une calmodulina. En mamíferos son conocidas como Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (Geisler y col., 2000). En *A. Thaliana* han sido llamadas ACA (Autoinhibited calcio ATPasas).
2. **Bombas de calcio no estimuladas por calmodulina:** Estas pertenecen a la subfamilia P_{2A} de las proteínas tipo P, la que está representada en *A. thaliana* por 4 proteínas (Figura 1). A esta subfamilia pertenecen las bombas tipo SERCA (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPasas) de mamíferos (Geisler y col., 2000), las que poseen propiedades farmacológicas características como es la inhibición por el sesquiterpeno lactona, thapsigargina. Son llamadas SERCA debido a que están presentes en el retículo sarco-endoplásmico de músculos de rata. En *A. thaliana* han sido llamadas ECA (endoplasmic reticulum-like calcium ATPasas).

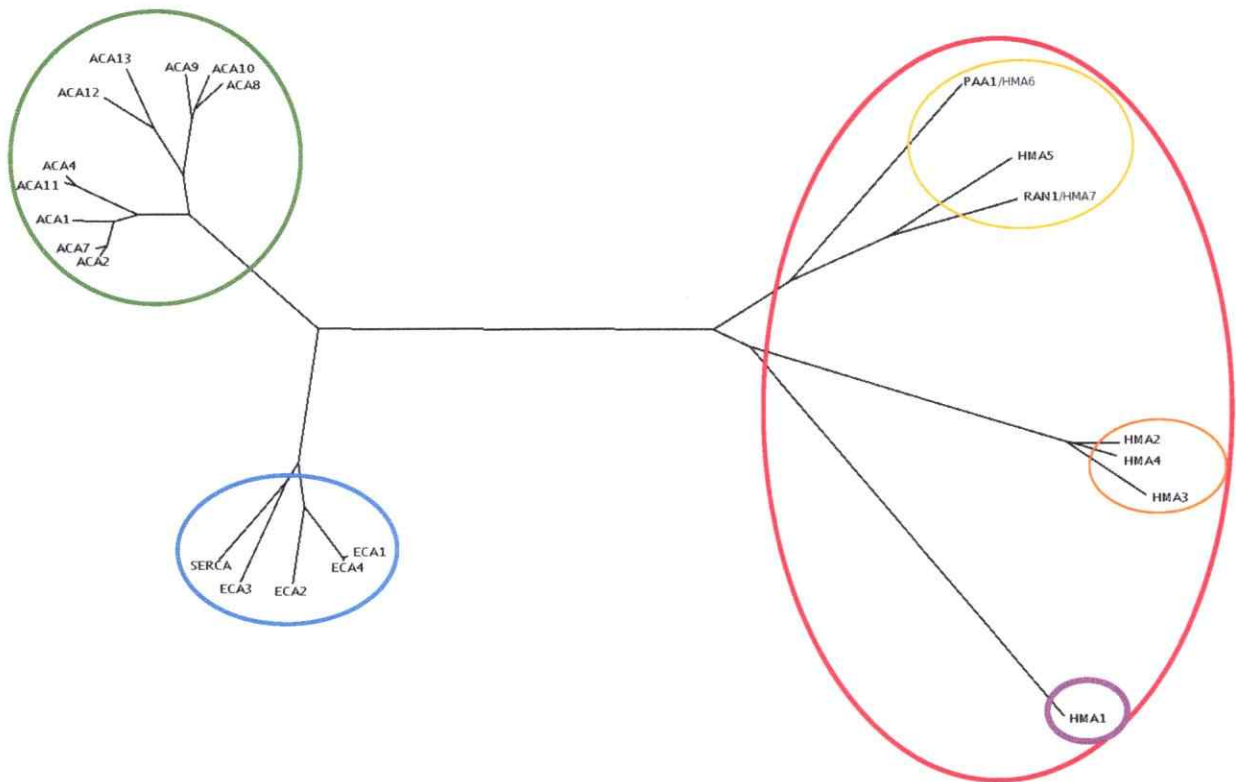
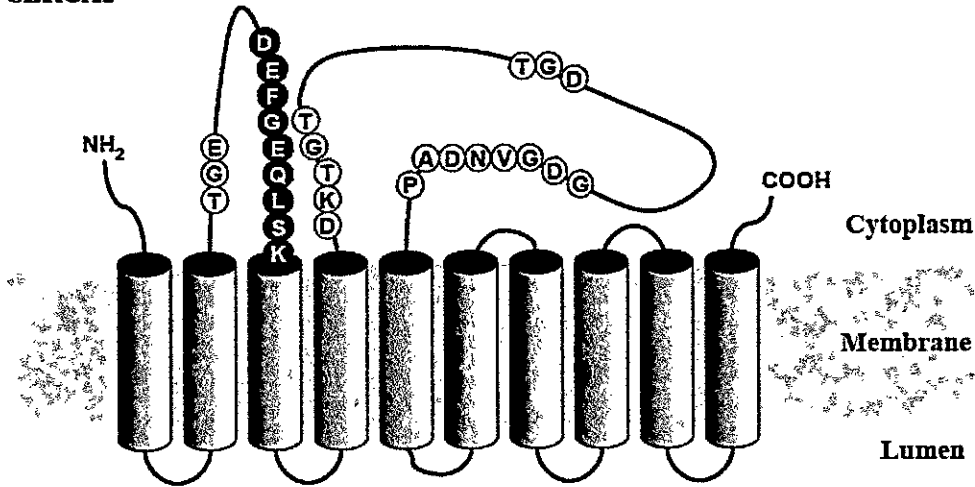


Figura 1. Árbol no enraizado obtenido del alineamiento de secuencias de las ATPasas tipo-P. Se utilizaron las secuencias de las proteínas de las subfamilias 1B (HMA) en rojo, 1A (ECA) y la proteína SERCA de *Mus musculus* en azul, y 2A (ACA) en verde de *Arabidopsis thaliana*. En amarillo se muestra el grupo que transportan Cu^+ y Ag^+ . En naranja se muestra el grupo que transporta metales divalentes como el Cd^{+2} y el Zn^{+2} . En violeta se muestra la proteína HMA1, la cual diverge mucho de los demás integrantes de su familia. Este árbol fue realizado en el programa ClustalX y editado con el programa splits tree.

A pesar de que en *A. thaliana* hay ATPasas similares a las SERCA de mamíferos, estudios bioquímicos no han encontrado en ellas inhibición por thapsigargina (Tg) (Sze y col 1998), lo que indica una clara diferencia de este tipo de bombas en plantas y mamíferos. Sin embargo estudios a nivel macro, han mostrado efectos de la Tg en el gravitropismo en *A. thaliana* (Urbina y col., 2006) y a nivel micro se ha identificado y descrito un transporte de calcio en el aparato de Golgi de arvejas y coliflor, el cual es inhibido por thapsigargina (Ordenes y col., 2002).

Con el fin de identificar este transportador que es inhibido por Tg, se estudio el mecanismo de inhibición y la presencia de alguna secuencia característica y necesaria para que esta ocurra.

A SERCA1



B AtHMA1

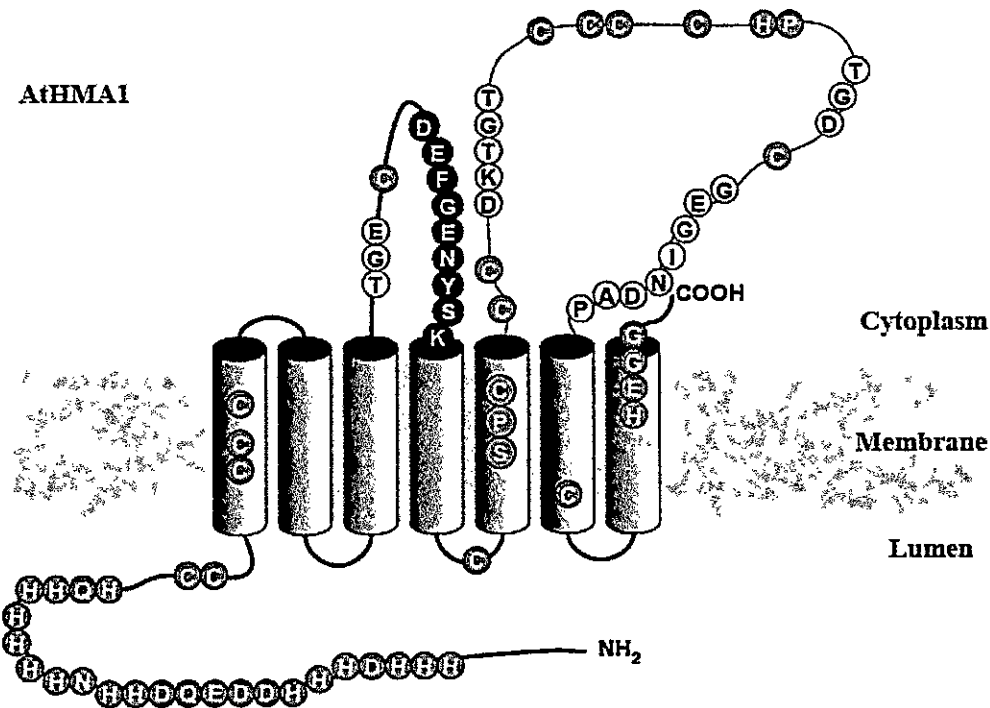


Figura 2. Esquema de las proteínas SERCA de mamíferos y la proteína HMA1 de *A. thaliana*. Los círculos blancos representan secuencia conservadas, características de las proteínas tipo P. Los círculos grises representan secuencias características de las proteínas tipo P que transportan metales pesados y los círculos negros representan el dominio característico y esencial de la inhibición por Thapsigargina.

1.1 Inhibición de los transportadores de calcio por thapsigargina

La thapsigargina (Tg) es un sesquiterpeno lactona producido por la especie vegetal *Thapsia garganica*. Se ha visto que este compuesto es capaz de inhibir específicamente los transportadores de calcio del tipo SERCA de mamíferos, lo que conlleva el aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, debido al bloqueo del transporte de Ca^{2+} hacia el retículo sarcoplásmico-endoplásmico. El mecanismo de la inhibición ha sido ampliamente estudiado y se han determinado los sitios y residuos involucrados en el proceso de inhibición (Stefan y col., 2004; Xu y col., 2004; Young y col., 2001).

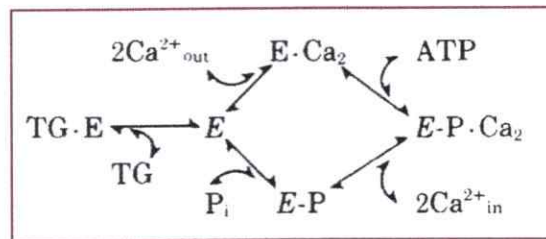


Figura 3. Esquema de los estados presentes en el ciclo de transporte de calcio por las ATPasas tipo P. En este se muestra el mecanismo de acción de las ATPasas tipo P y el estado que se estabiliza con la unión de la Thapsigargina (TG-E).

La inhibición se produce por una estabilización de la proteína en un estado intermedio (estado E2) (Figura 3), lo cual impide la continuación del ciclo y por lo tanto del transporte. Estudios de proteínas quiméricas, mutaciones puntuales y rayos X han llevado a la conclusión que la thapsigargina se une al tercer tallo de la proteína (Figura 2A), en la interfase del citosol y la membrana plasmática, a una secuencia aminoacídica muy conservada (DEFGEQLSK), la cual es responsable de esta unión (Stefan y col., 2004; Xu y col., 2004; Young y col., 2001).

Se ha descrito, bioquímicamente, un transporte de calcio y metales pesados en el aparato de Golgi de arvejas y de coliflor (Ordenes y col., 2002) que sufren inhibición competitiva entre ellos y por Thapsigargina. Todo esto sugiere que existe un transportador capaz de transportar activamente

Calcio y metales pesados, el cual debería presentar los elementos conservados de la inhibición por Tg revisados con anterioridad. Buscando estos elementos en el genoma de *Arabidopsis* se encontró una proteína que posee una secuencia muy similar a la secuencia DEFGEQLSK, descrita como la secuencia de unión a Thapsigargina, la cual estaría en la vecindad de la membrana, según predicciones bioinformáticas. Esta proteína está anotada como una ATPasa tipo P, perteneciente a la subfamilia de los transportadores de metales pesados y fue llamada At-HMA1 (Figura 1 y Figura 2).

En una primera aproximación se realizaron ensayos de complementación en levaduras carentes de bombas de calcio. Los cuales demostraron que HMA1 complementa dichas levaduras, o sea HMA1 estaría supliendo el transporte faltante. También se realizaron complementaciones en levaduras mutantes, sensibles a metales pesados, las cuales se hicieron tolerantes a estos. Para comprobar la inhibición por Tg se realizaron ensayos de transporte de calcio donde se pudo observar la inhibición de este (Moreno y col, 2008). Para analizar HMA1 es necesario conocer un poco de la subfamilia a la cual pertenece.

1.2 Transportadores de metales pesados (HMAs)

Las ATPasas tipo P son una superfamilia de proteínas transportadoras de sustratos cargados (Palmgren y col., 1998), que se distinguen por la formación de un intercambiador fosforilado en el ciclo de reacción. Estas catalizan específicamente, ya sea la captación o extrusión hacia el medio extracelular de Cd^{2+} o Cu^{2+} así como de una variedad de iones mono y divalentes (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , H^+), (Williams y col., 2005.). Un grupo de ATPAsas tipo P son las llamadas HMAs (Heavy Metal ATPases) que contribuyen a la homeostasis y detoxificación de metales pesados. Este grupo se caracteriza por tener la mayor diversidad de secuencia entre sus miembros. Así, en *Arabidopsis thaliana* hay 7 miembros que pertenecen a este grupo, los cuales a su vez pueden ser separados en 2 grupos, basados en alineamientos de secuencias aminoacídica y estructura génica (Figura 1) (Cobbett y

col., 2003). Se cree que las proteínas del grupo 1 podrían estar transportando Ag^+ y Cu^+ , y las proteínas del grupo 2 serían capaces de transportar Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} y Pb^{2+} .

Se ha visto que las proteínas HMA2-4 (Hussain D. y col. 2004; Gravot y col., 2004; Mills y col., 2003) están involucradas en la homeostasis de Zn^{2+} y posiblemente en la tolerancia a Cd^{2+} . Por otro lado las proteínas HMA6 y HMA7 actúan en el transporte de Cu^+ en el cloroplasto (Shikanai y col., 2003; Abdel-Ghany y col., 2005). Con respecto a la proteína HMA1 no se sabe mucho (Seigneurin-Berny y col. 2005). Según su secuencia, esta está clasificada dentro de los transportadores de iones divalentes como el Cd^{2+} y Zn^{2+} , sin embargo ella se encuentra filogenéticamente alejada de ambos grupos, dejando en claro una diferencia con los demás transportadores de metales pesados. Al analizar la secuencia aminoacídica de HMA1, se puede observar además de las secuencias características de todas las P-ATPasas, una secuencia que es compartida con las Calcio ATPasas. Esta secuencia, LDEFGEXXSK, es la que se ha caracterizado como el sitio de unión a thapsigargina. Este dominio está presente en el tallo del segmento TM5 en HMA1 (Figura 2) (en el tallo del segmento TM3 en SERCAs). Se ha descrito, que este motivo es capaz de unir thapsigargina gracias a fuerzas hidrofóbicas, esta unión es muy rígida, lo que produce una estabilización de la proteína en un estado intermedio bloqueando así el ciclo de transporte lo que conlleva a la inhibición del transporte de iones por parte de la bomba. Por lo que hemos visto con anterioridad, HMA1 tendría la capacidad de transportar metales pesados y calcio, en sistemas heterólogos, pero ¿cual será su función en *Arabidopsis* ¿Estará HMA1 jugando algún rol en la homeostasis de calcio? Para respondernos esta pregunta es necesario encontrar alguna estrategia que nos permita analizar el calcio dentro de la planta.

1.3 Estrategia de estudio del transporte de Ca^{2+} .

Como fue mencionado anteriormente, en general los estudios de transporte de calcio *in vitro* se llevan a cabo mediante el uso de Ca^{2+} radioactivo. Existen otras técnicas para hacer estudios *in vivo* y en tiempo real de la concentración de calcio como son el uso de sondas fluorescentes y la apoproteína bioluminiscente Apoaequorina. Esta última, es una apoproteína la que unida al grupo prostético Coelenterazina, se reconstituye y es capaz de emitir luz al unir moléculas de calcio (Figura 4).

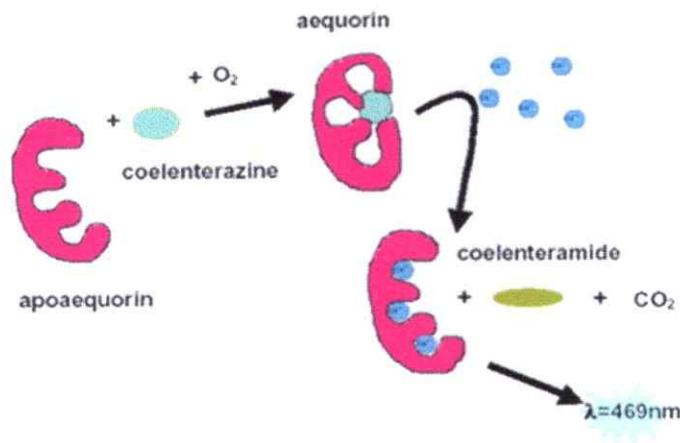


Figura 4. Mecanismo de luminiscencia de la apoproteína Aequorina. La apoproteína es reconstituida mediante la unión de Coelenterazina lo que produce una proteína luminiscente llamada Aequorina. Esta al unir Calcio (círculo azul) oxida la Coelenterazina y emite un fotón. (Mithofer y col., 2002)

Esta luz puede ser medida por un luminómetro y posteriormente transformada en concentración de calcio. Estudios de este tipo se han llevado a cabo tanto en células vegetales como también en células animales (Mithofer y col., 2002; Takahashi y col., 1999). Las principales ventajas de esta técnica son su bajo ruido debido a que la autoluminiscencia es muy baja y además que, a diferencia de algunas sondas fluorescentes, la unión de calcio es transitoria, por lo que no se genera un efecto tampón sobre el calcio, o sea la proteína une el ion por un periodo de tiempo muy corto, lo que no provoca

cambios en la concentración del ion libre. Otra ventaja es que al ser una proteína, se pueden introducir por técnicas de biología molecular de forma estable o transiente, y se puede generar proteínas quimeras, para dirigirla a distintos organelos (Brini y col., 1999; Chiesa y col., 2001), lo que se ha realizado para vacuola (Knight y col., 1996), retículo endoplásmico (Alvarez y col., 2002), mitocondrias (Logan y col., 2003) y aparato de Golgi (Ordenes, datos en prensa).

Nuestro grupo de investigación posee dos líneas de plantas transgénicas de *A. thaliana*, una que sobreexpresa el gen que codifica para la aequorina, lo que provoca su acumulación en el citosol. La segunda línea expresa el gen que codifica para la Aequorina fusionada a una señal de retención en el aparato de Golgi, logrando una acumulación específica en el aparato de Golgi. En esta tesis con el fin de estudiar y dilucidar el rol de HMA1 en la homeostasis de calcio, como también en la señalización mediada por este ion, se generaron 3 líneas transgénicas más. Estas líneas consisten en el silenciamiento de HMA1 tanto en las líneas "wildtype", como en las líneas transgénicas que expresan el gen de la Aequorina. Para el silenciamiento de HMA1 se utilizará la técnica de RNA interferencia.

1.4 RNA interferencia

Es un mecanismo de silenciamiento post transcripcional inherente de las células eucariotas. Fue observado por primera vez en *Caenorhabditis elegans*. En este experimento se intentó sobreexpresar un gen, sin embargo lo que se observó fue un silenciamiento de este (Fire y col., 1999) lo que llamó la atención de los investigadores.

El mecanismo involucra una serie de proteínas y complejos proteicos además de RNAs pequeños (small interference RNA). Estos RNAs pequeños, de aproximadamente 20 nucleótidos son capaces de unirse de forma complementaria al RNA mensajero, lo que desencadena y guía una serie de procesos que llevan a la degradación del RNA mensajero (Figura 5). En plantas, los RNAs pequeños se pueden generar a partir de un RNA de doble hebra (dsRNA), el cual es procesado por la proteína DICER, la

que produce los RNAs pequeños. Estos se unen al complejo proteico RISC (RNA-induced silencing complex) y lo dirigen al RNA mensajero blanco. Una vez ahí se produce la degradación del RNA mensajero.

Para generar el RNA de doble hebra (dsRNA) que inicia todo el proceso, basta con expresar un constructo que de origen a un RNA con los extremos complementarios. La eficacia del RNA interferencia se ha visto aumentada si entre los extremos complementarios del RNA de doble hebra, se coloca una secuencia espaciadora, principalmente un intrón (Agrawal y col. 2003).

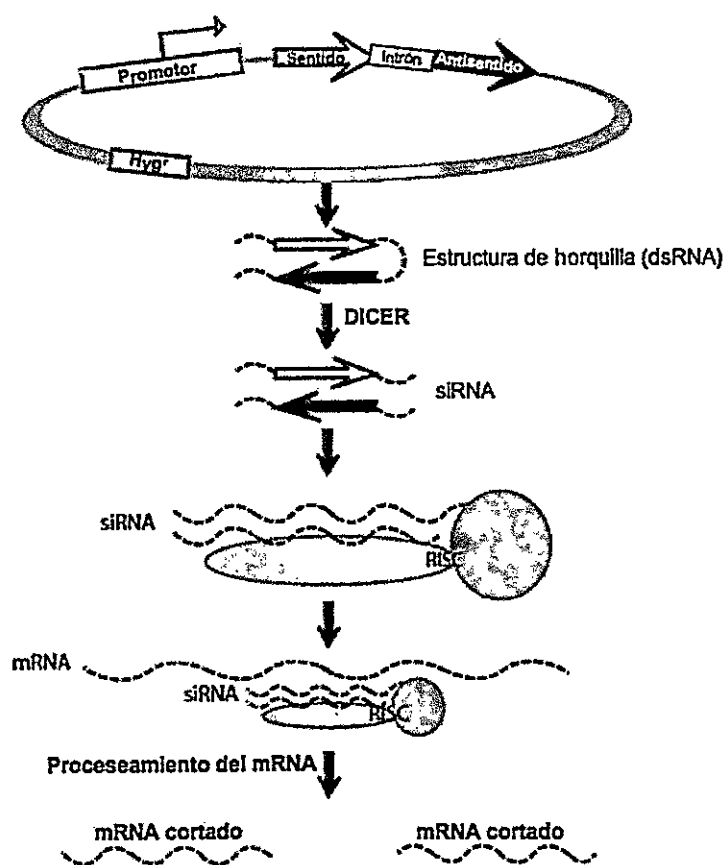


Figura 5 . Mecanismo de silenciamiento mediado por RNA interferencia. El constructo introducido es expresado, lo que genera un RNA de doble hebra. El RNA de doble hebra es procesado por la proteína DICER generándose los RNAi cortos. Estos son unidos por el complejo proteico RISC al cual guían hasta el mRNA, el cual es procesado y degradado. (Kusaba, 2004).

Esta técnica, además de mostrarse eficiente y específica, da al investigador la libertad de hacer modificaciones sobre el constructo como agregar reguladores o inductores de la expresión, obteniéndose así un control sobre el silenciamiento (Zuo y col. 2000; Zuo y col. 2001; Guo y col. 2003). En este sentido se han desarrollado varios sistemas de inducción del silenciamiento. En este trabajo se utilizó el sistema de RNA interferencia inducible químicamente con β -estradiol desarrollado por el Dr. Nam Hai Chua de la Rockefeller University. Este sistema consiste en un regulador transcripcional que se activa al unir el compuesto químico, lo cual induce la expresión del constructo introducido (Zuo y col. 2000). Utilizando este sistema pensamos tener un control sobre el silenciamiento, y de esta manera realizar los experimentos sin que el organismo logre adaptarse a las nuevas condiciones biológicas.

De acuerdo a la información indicada, HMA1 es capaz de transportar Calcio, y es inhibido por thapsigargina, en levaduras. Sin embargo, para dilucidar y comprobar su papel en la homeostasis de calcio de las células vegetales es necesario desarrollar un sistema completo que nos permita comprobar esta hipótesis. Para esto se mezclarán técnicas de biología molecular como el RNA interferencia con técnicas de bioluminiscencia para analizar los cambios en la concentración de calcio. El estímulo que se caracterizará será el frío ya que este es de gran amplitud y ha sido altamente estudiado como inductor de la señalización por calcio. De esta forma se espera desarrollar un sistema que permita discriminar la función de HMA1 en la homeostasis de calcio.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Generar e implementar un sistema de análisis de HMA1 para determinar su función y su papel en la homeostasis de Calcio.

2.2 Objetivos Específicos

1. Generar un constructo que posea un RNA interferencia específico para *hma1*.
2. Obtener plantas transgénicas con el constructo de RNA interferencia.
3. Obtener plantas silentes para *hma1* en la línea “wildtype” + RNAi.
4. Caracterizar las variaciones en la concentración de Calcio citosólico provocada por un estímulo frío.
5. Caracterizar las variaciones en la concentración de Calcio en el aparato de Golgi provocadas por un estímulo frío.

3 Materiales y métodos

3.1 Equipos

Los equipos utilizados fueron los siguientes: Termociclador MiniCycler™ MJ Research, transiluminador UV, fuente de poder Bio-Rad, Sistema de electroforesis Mini Protean Bio-Rad, Espectrofotómetro UV-visible, luminómetro Sirius Berthold, Centrífuga Sorvall RC2-B, centrifuga Hettich Universal 320, Ultracentrifuga Sorvall Discovery 100SE, Lector de microplacas Universal Microplate Reader EL, cámara de cultivo termoregulada.

3.2 Reactivos y enzimas

Los reactivos utilizados en el desarrollo de esta tesis fueron de grado pro análisis y fueron adquiridos generalmente desde Sigma Chemical, Merck y Phytotechnology. Los reactivos para biología molecular entre los cuales cuentan las enzimas de restricción *NotI*, *SpeI*, *BamHI* y *BglII*, T4 ADN ligasa, los desoxiribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y los estándares de peso molecular de ácidos nucleicos (1Kb, y 100 pb), fueron adquiridos desde Invitrogen. La Taq ADN polimerasa se adquirió desde Biosonda. Los kit comerciales utilizados para la purificación de productos de PCR, ADN plasmidial y ADN a partir de geles fueron adquiridos desde Fermentas.

Las enzimas para el aislamiento de los protoplastos: celulasa y pectinasa, fueron adquiridos en Sigma Chemicals.

3.3 Antibióticos

Los antibióticos Kanamicina, Rifampicina, Spectinomycin y Gentamicina fueron adquiridos

desde Sigma Chemicals. El antibiótico Hygromicina fue adquirido desde Calbiochem.

Las soluciones stock de antibióticos se prepararon en H₂O nanopura y fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de poro de 0,22µm (Millipore). Los antibióticos se prepararon en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp, 100mg/mL), gentamicina (Gen, 100mg/mL), kanamicina (Kan, 50mg/mL), rifampicina (Rif, 100mg/mL en dimetil sulfóxido), spectinomina (Spe, 50mg/mL) e higromicina (Hig, 100mg/mL).

3.4 Mezcla de tierra utilizada para el cultivo de plantas

Para el cultivo de plantas en tierra se utilizó la siguiente mezcla: 3 partes de tierra de litre (H.Lee M.), y 2 partes de vermiculita (Harbolite).

3.5 Material vegetal

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0), fueron esterilizadas en una solución de 10% hipoclorito de sodio, 0,1% Triton X-100 (TX-100) por 30 minutos, luego fueron enjuagadas 10 veces con agua estéril. Estas semillas fueron sembradas en esterilidad en medio MS sólido (0,5X; 0,8% Agar) (Murashige y Skoog, 1962) con o sin antibióticos. Las placas con semillas fueron incubadas en una cámara de cultivo a 25°C con un fotoperíodo de 16/8 h. (luz/oscuridad). A los 15 días post-germinación (aproximadamente) las plántulas fueron trasplantadas a la mezcla de tierra/vermiculita descrita anteriormente y luego fueron mantenidas en una cámara de cultivo a 25°C y con un fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad).

De la misma forma se sembraron semillas de dos líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* obtenidas con anterioridad en el laboratorio. Estas líneas expresan el gen recombinante que codifica

para la apoproteína bioluminiscente dependiente de Ca^{+2} llamada Aequorina. En una de las líneas esta apoproteína es soluble y se acumula en el citosol de las célula, y en la otra línea aequorina se acumula en el aparato de Golgi (Ordenes y cols. en prensa).

3.6 Cepas bacterianas

En los procesos de manipulación y replicación de ADN plasmidial se utilizó *Escherichia coli* cepa DH5 α como hospedero. Para los procesos de transformación genética de plantas se utilizó la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. Esta cepa contiene el plásmido Ti, el cual posee todos los genes necesarios para la transferencia e inserción del ADN foráneo al genoma de la planta. Este plásmido posee además los genes que le confieren resistencia a los antibióticos Gentamicina (Gen) y rifampicina (Rif). Debido a esto, todos los plásmidos utilizados para su transformación confieren resistencia un antibiótico distinto.

3.7 Preparación de células competentes de E. coli DH5 α .

Las células competentes se prepararon según el método descrito por Zhiming Tu y col. (1998). Se inoculó 10 ul de E. coli en 40 ml de medio LB. Estas se incubaron a 37°C, con agitación a 200 RPM. Se esperó que el cultivo obtuviese una DO₆₀₀ entre 0,2 a 0,4. Luego el cultivo fue centrifugado a 8000 rpm durante 1 minuto a 4°C. El pelet fue resuspendido en medio volumen de buffer TB esteril, e incubado durante 25 minutos en hielo. Luego de otro paso de centrifugación, el pellet fue resuspendido en un decimo de volumen de buffer TB y alicuotado en 200 ul.

3.8 Transformación de células competentesde E. coli DH5 α .

La transformación se levó a cabo mediante el protocolo de shock de calor. Este consiste en agregar el ADN foraneo a 200 ul de células competentes. Se incuba en hielo durante 30 minutos. Luego se incuba la mezcla a 42°C durante 90 segundos y luego se incuba durante 2 minutos en hielo

nuevamente. Una vez realizado esto, se agrega 800 μ l de medio LB y se incuba durante 1 hora a 37°C. El resultado es sembrado en una placa de LB+Agar con el antibiotico de selección.

3.9 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Las células competentes se prepararon según el método descrito por Chen y col. Se inoculó *Agrobacterium tumefaciens* en medio LB, y se incubó a 28°C hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ = 0,5-0,6. Se enfrió el cultivo en hielo durante 10 minutos, y luego se centrifugó a 3000 g por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 1 ml de una solución de CaCl₂ 20 mM. Luego se alicuotó y se congelaron a -80°C.

3.10 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 se realizó siguiendo el protocolo descrito por Chen y col. 1994. Se le agregó 1 μ g del ADN del vector de interés a 100 μ L de células competentes preparadas según lo descrito arriba. La mezcla fue sumergida en nitrógeno líquido por 5 minutos. Luego fue incubada a 37 °C por 25 minutos y seguido se agregó 1ml de medio LB con los antibióticos de selección correspondientes y se incubó a 28°C por 3 horas. La mezcla fue luego esparcida en placas con medio LB solidó suplementadas con los antibióticos de selección correspondientes.

3.11 Material Plasmidial

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizaron los siguientes plasmidios de ADN:

pER8: vector binario que presenta un sistema de expresión inducible químicamente por β -estradiol. Este sistema consta del promotor sintético G10-90 (Ishige y col. 1999) que controla la expresión de XVE, el cual codifica para un factor de transcripción quimérico que contiene el dominio

de unión a ADN LexA (residuos 1-87), el dominio de activación de VP16 (residuos 403-479) y la región reguladora del receptor humano de estrógenos. En otro sector, río abajo, posee 8 copias del operador Lex-A, las que están río arriba de un promotor mínimo (Figura 6). Entonces al activarse el factor de transcripción quimérico con la unión de β -estradiol, se une al operador Lex-A, activando la expresión del gen río abajo. Además este vector otorga resistencia a los antibióticos Hygromicina (*Hyg*) y spectinomycin (*Spe*). Este vector fue donado por el Dr. Nam Hai Chua de la Rockefeller University.

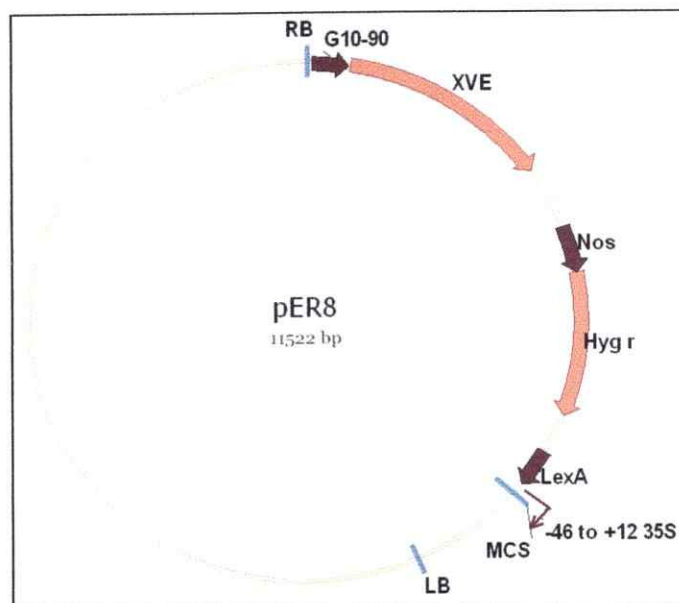


Figura 6. Mapa del Vector pER8. En este esquema se observan los componentes principales del vector pER8. (RB) right border; (LB) left border; (G10-90) promotor sintético; (XVE) factor de transcripción quimérico; (Nos) promotor Nos; (Hyg r) gen de la Hygromycin phosphotransferase, que otorga resistencia a este antibiótico; (LexA) copias del operador LexA; (MCS) sitio de múltiple clonamiento.

pGEM-T: Vector de clonamiento Promega®. Este vector comercial confiere resistencia al antibiótico Ampicilina, además posee un sistema de inactivación de la enzima β -galactosidasa. Este sistema permite discriminar fenotípicamente bacterias que poseen el vector autoligado de bacterias que

poseen el vector con ADN exógeno. Otra característica de este vector es que se encuentra linearizado y presenta extremos cohesivos de timidina en los extremos 3' de ambas hebras. Los extremos cohesivos aumentan significativamente la eficiencia de ligación con fragmentos de ADN, a los que se les han agregado extremos cohesivos de adenina (Sambrook y col. 1989). Los fragmentos de ADN son obtenidos a través de la técnica de PCR.

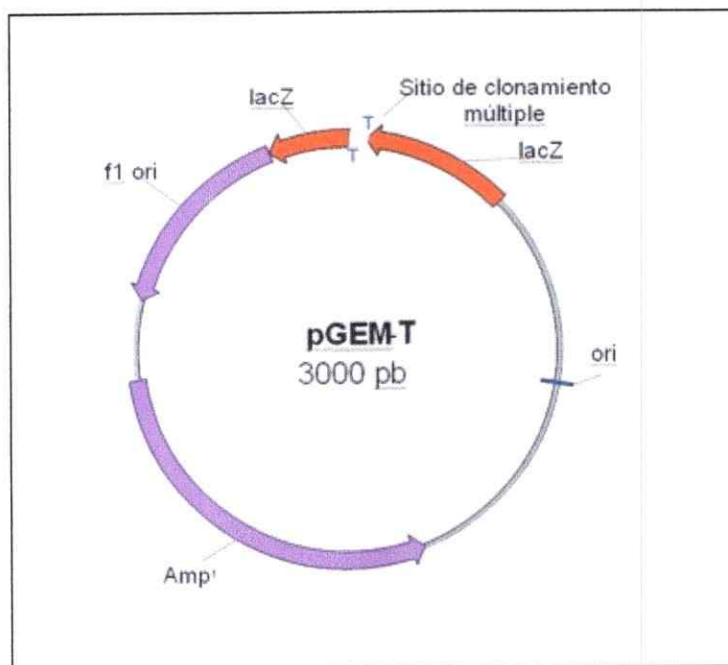


Figura 7. Mapa del vector pGEM®-T. Al ligar productos de PCR con extremos cohesivos de AA en este vector, se interrumpe la secuencia de *lac Z* (α -complementación) lo que se traduce en la pérdida de coloración azul (actividad β -galactosidasa) que presentan las bacterias que contienen el vector autoligado o ligado sin inserto.

3.12 Oligonucleotidos

En el desarrollo de esta tesis fueron diseñados los siguientes oligonucleotidos.

Nombre	Partidor
<i>Hyg F</i>	5' AGA CCT GCC TGA AAC CGA ACT G 3'
<i>Hyg R</i>	5' CAC GGC CTC CAG AAG AAG ATG T 3'
<i>FexctRT</i>	5' ATG ATG TTA ACT GGG GAC C 3'
<i>Trihib1 R</i>	5' GGT GTT GAA GAT CTA CTT ACG TAT GTA CAA TCT TGT TAA GCG TC 3'
<i>Trihib2 F</i>	5' GAC GCT TAA CAA GAT TGT ACA TAC GTA ACT AGA TCT TCA ACA CC 3'
<i>Trihib3 R</i>	5' GAC GCT TAT CAA GAT TGT ACA GGA ATT CTG CAA ACA CAC AAG ACA AT 3'
<i>Trihib4 F</i>	5' GTC TTC TGT GTT TGC AGA ATT CC TGT ACA ATC TTG TTA AGC GTC GAA TCA TTC 3'
<i>Fhma1</i>	5' GAT TGT TGG TTT TCC TCT TGT TGG 3'
<i>Exct'3</i>	5' CTA ATG TGC AGA GCT TAA ACT GTT GCT GCT GCT ACT 3'
<i>Fintron</i>	5' TAC GTA ACT AGA TCT TCA ACA CC 3'
<i>Rintron</i>	5' GGA ATT CTG CAA ACA CAC AAG ACA AT 3'
<i>Act F</i>	5' GTTGGGATGAACCAGAAGGA 3'
<i>Act R</i>	5' GAACCACCGATCCAGACACT 3'

3.13 Medios de cultivo.

3.13.1 Cultivos bacterianos.

Para el cultivo de Bacterias se utilizó el medio Luria-Bertani (LB), compuesto de bacto triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L. Para medios sólidos se agregó agar 15 g/L.

3.14 Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN provenientes de PCR o plasmidiales fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo del tamaño del ADN analizado, las concentraciones de agarosa variaron entre 0,8-2%. Cada muestra de ADN cargada en el gel fue preparada con una solución tampón de carga (azul de bromofenol 0.25% p/v y glicerol 50% v/v en tampón TE). La electroforesis fue llevada a cabo en solución tampón TAE (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM pH 8,3) y BrEt 0,2 µg/mL y se utilizó un voltaje de 90 volts por 30-60min, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar.

3.15 Purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa

Una vez finalizada la separación de los fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa, se procedió a extraer el fragmento de interés y se purificó utilizando el kit de extracción de geles Gel ADN extraction Kit, Fermentas.

3.16 Digestión de ADN mediante enzimas de restricción.

Para la digestión se utilizó entre 1-5 U por cada µg de ADN y se utilizó el tampón correspondiente para cada enzima. La mezcla se incubó durante 16 horas a la temperatura correspondiente para cada enzima.

3.17 Ligación de fragmentos de ADN

Los productos de PCR o de digestión se ligaron con vectores de clonamiento en una razón molar de 1:3 de vector respecto al inserto. Para esto se utilizó 1µl de la enzima T4 ADN ligasa de Promega, con su respectivo tampón 2x, se utilizó 25-50ng de vector y entre 200-300ng de inserto. Se ligó a 4°C durante toda la noche y luego se transforma de acuerdo a los protocolos descritos.

3.18 Purificación de ADN plasmidial

Para la purificación de ADN plasmidial desde bacteria se utilizó el kit de purificación de plasmidios Plasmid Midiprep Kit de E.Z.N.A. Omega Bio-Tek. El protocolo que se utilizó es el descrito por el fabricante, y se llevo a cabo con 100 ml de cultivo inicial.

3.19 Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó por una separación en geles de agarosa, luego la banda que contiene el fragmento de ADN de interés se cortó del gel con un bisturí y se purificó con un kit de extracción de geles Gel ADN extraction Kit, Fermentas. Para la purificación se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

3.20 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En todas las reacciones de PCR se utilizó la Taq DNA polimerasa de Promega con su solución tampón correspondiente, MgCl₂ 1,5mM final, dNTPs 0,8mM final. Los partidores se utilizaron a una concentración de 0,5 µM y se ocupó entre 50-200 ng de ADN como templado. El modelo del termociclador utilizado fue PTC-100 (MJ research) donde se usó el siguiente programa: un ciclo de

denaturación inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 3 etapas, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a una temperatura de entre 50-60°C dependiendo de la T_m de los partidores utilizados, y un tiempo entre 30 segundos a 2 minutos de elongación a 72°C, dependiendo del tamaño del amplificado; finalmente una etapa de elongación de 10 minutos. a 72°C.

3.21 RT-PCR

Para obtener el ADNc a partir de ARN se realizó transcripción reversa según el siguiente protocolo:

Se incubo el ARN con óligos de timidina (oligodT) (25 ng/μl) por 10 minutos a 70°C. Luego se incubó en hielo 3 minutos, y se adicionó tampón 5X, inhibidor de RNAsa (25 unidades), Transcriptasa Reversa M-MLV (200 unidades), dNTP (10 μM) y agua DEPC. La mezcla de reacción presentó un volumen final de 25 μl y fue incubada a 37° C por 4hr, finalmente se utilizó el ADNc obtenido como templado para las reacciones de PCR que se realizaron como se describe previamente.

3.22 PCR traslapado

Esta técnica consiste en amplificar por PCR el par de secuencias de ADN que se desean fusionar, utilizando partidores híbridos, para obtener secuencias “híbridas” complementarias entre sí que luego son utilizadas como “autopartidores” para una reacción de PCR final que forma el constructo de fusión. La Figura 8 explica paso a paso el procedimiento seguido.

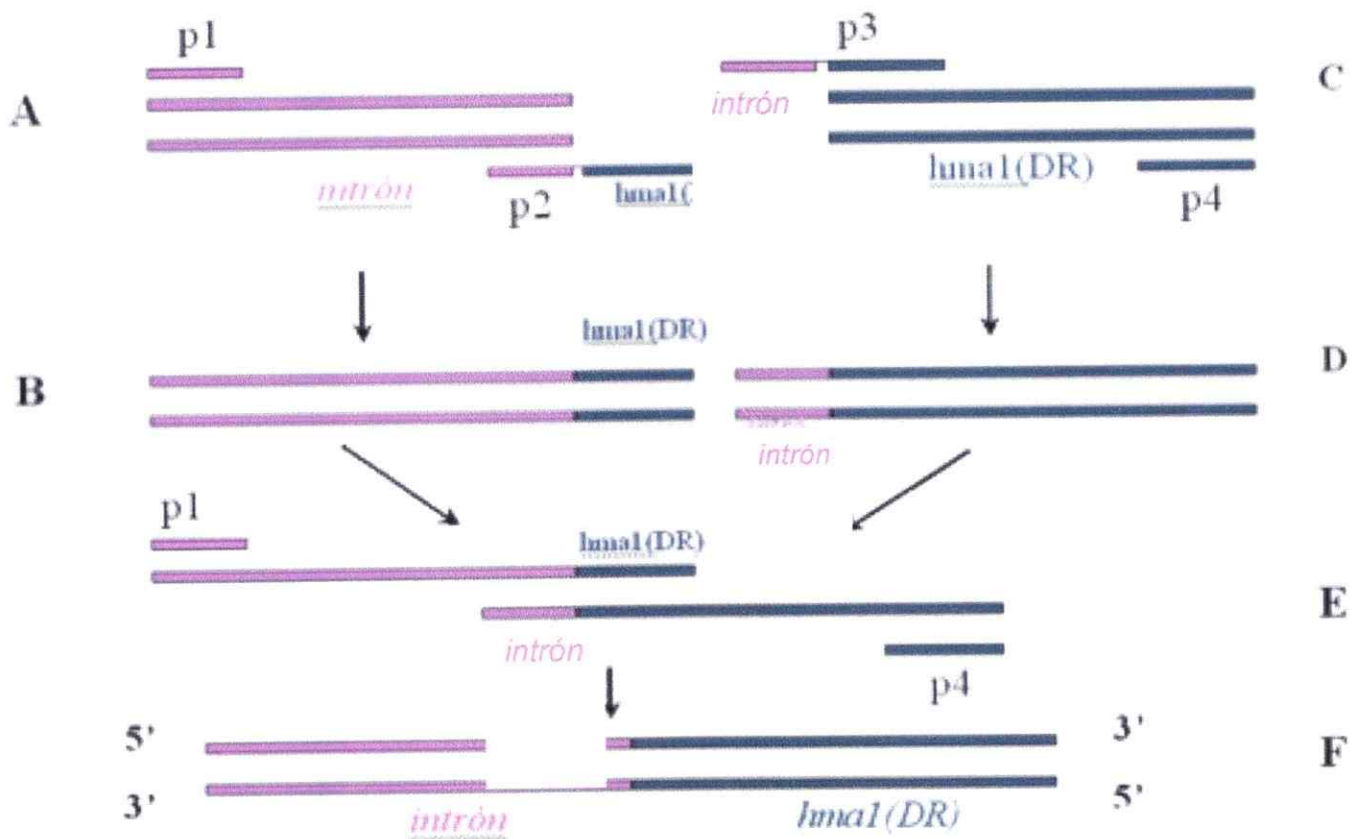


Figura 8. Fusión de las secuencias intrón y hma1(DR) usando extensión por PCR traslapado. **A.** Amplificación por PCR del *intrón* de la actina 11: El partidor p2, partidor híbrido que posee una “punta” complementaria al intrón y una “cola” complementaria a hma1, permite la amplificación desde el extremo 3’ de la secuencia, incorporándose a ésta un fragmento de 12 pb del extremo 5’ de la secuencia de hma1(DR). **B.** El producto de PCR generado es un intrón con una “cola” del fragmento de hma1. **C.** Amplificación por PCR del fragmento antisentido de hma1 (DR): El partidor p3, partidor híbrido que posee una “punta” complementaria al intrón y una “cola” complementaria a hma1, permite la amplificación desde el extremo 5’ de DR e incorpora a la secuencia un fragmento de 27 pb del extremo 3’ del *intrón*. **D.** El producto de PCR generado es DR con una “punta” de la secuencia del *intrón*. **E.** Ambos productos de PCR “híbridos” son utilizados en una reacción de PCR conjunta, donde la “cola” del intrón, complementaria a DR, hace apareamiento de bases con su secuencia complementaria y la “punta” de hma1, complementaria al intrón, hace apareamiento de bases con su secuencia complementaria en el *intrón*. Desde ambos sitios de apareamiento comienza la extensión, generándose el producto de fusión que es a su vez amplificado usando los partidores p1 y p4 (F). Los partidores de los extremos amplifican el fragmento completo.

3.23 Diseño de los partidores de ADN utilizados en las reacciones de PCR traslapado.

Para emplear la técnica descrita anteriormente en la generación del constructo RNAi, el cual

consta de un fragmento de *hma 1* en dirección sentido (IZ) seguido de un intrón del gen de la Actina 11 de *A. Thaliana* (IN) y finalmente el mismo fragmento de *hma1* en dirección antisentido (DR).

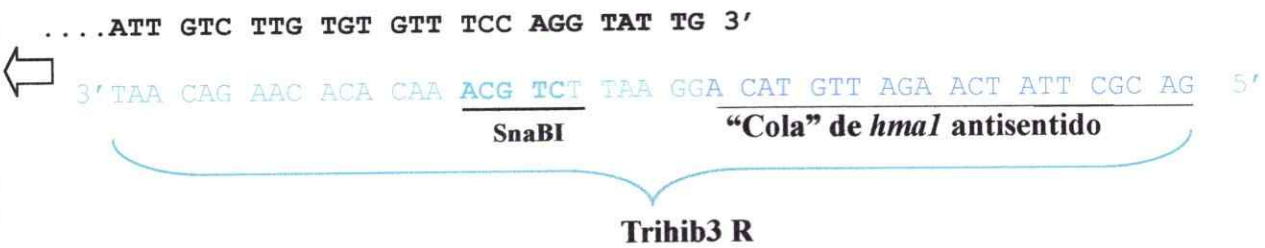
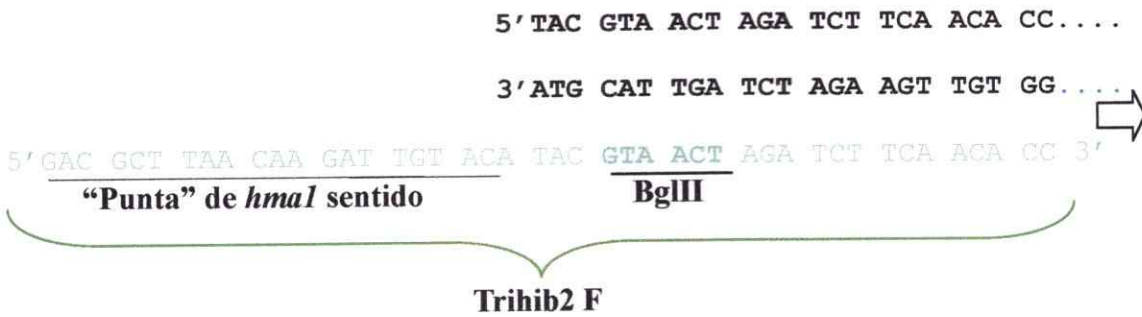
Para la fusión del *intrón* al fragmento *antisentido de hma1*, se diseñaron partidores para las regiones 5' y 3' con las modificaciones necesarias para insertar los fragmentos "cola o "punta". Posteriormente se utilizó el sitio de corte de la endonucleasa BglII, presente en la secuencia del intrón, para el siguiente subclonamiento de *INDR* en el plásmido pGEM[®]-IZ.

Todas las amplificaciones por PCR traslapado fueron realizadas usando una polimerasa de ADN.

3.24 Partidores para fusión INDR:

La amplificación del *intrón* se realizó utilizando como templado el ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* y utilizando un partidores específicos para el (Finaron y Rintron). Para la amplificación de los fragmentos de *hma1* se utilizó un plásmido que contiene el ADNc de *hma1*, obtenido en Rikken, utilizando los partidores Fhma1y Exct3'.

Este amplificado fue purificado desde un gel de agarosa y utilizado como templado para una reacción de PCR pero con los partidores que presentan la "punta" y la "cola" de *hma1* (sentido y antisentido respectivamente), de esta manera se incorpora a los fragmentos la "punta" y la "cola" (figura 9).



. . . . TAA CAG AAC ACA CAA AGG TCC ATA AC 5'

Figura 9. Partidores para la amplificación del intrón con “cola” de DR. En A se muestra el extremo 5' sentido del intrón, su secuencia antisentido y el partidor Trihib 2 F diseñado. En B se muestra el extremo 3' sentido del intrón, su secuencia antisentido y el partidor Trihib 3 R diseñado. La flecha indica la dirección en la que procede la amplificación de las secuencias.

Paralelamente se amplificó el *hmal* antisentido desde el mismo plásmido utilizando el partidor con “punta” del intrón, y un partidor reverso exacto (figura 10).

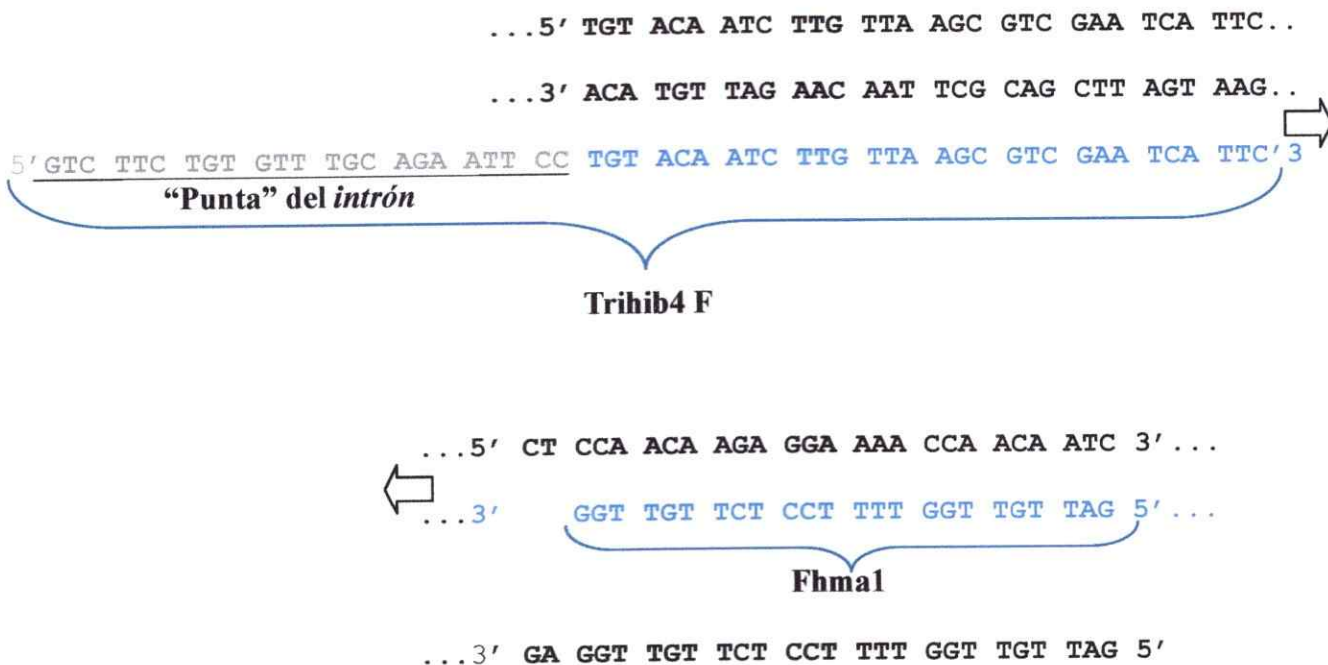


Figura 10. Partidores para la amplificación de DR (hma1 antisentido) con "punta" del intrón. En A se muestra el extremo 5' sentido de DR, su secuencia antisentido y el partidor Trihib 4 F diseñado. En B se muestra el extremo 3' sentido de DR, su secuencia antisentido y el partidor Fhma1 diseñado.

3.25 Construcción del RNAi para hma1.

Como punto de partida, fue seleccionada una secuencia del gen blanco (hma1) que tuviera la menor homología con otros genes de *Arabidopsis*, y se diseñaron partidores específicos para su amplificación por PCR.

Paralelamente, se amplificó el tercer intrón del ADN genómico del gen codificante para la actina11 (~198 pb), utilizando partidores específicos que contuvieran los bordes del intrón además de sitios de restricción. La fusión entre el intrón y el fragmento antisentido se realizó por medio de extensión por PCR traslapado. El fragmento obtenido fue clonado en el vector pGEM-T. Para tener el

RNAi completo fue necesario amplificar nuevamente por PCR el fragmento de *hma1* sin embargo en este caso se utilizó un partidor híbrido con la punta del intrón, y fue también clonado en el vector pGEM-T.

Finalmente, los dos vectores obtenidos fueron cortados con las enzimas de restricción NotI y BglII, se purificaron las bandas de interés y se procedió a clonar, obteniéndose el vector pGEM-IZINDR, el cual posee el constructo de silenciamiento completo (Figura 11)

Una vez obtenido los dos vectores se procedió con el subclonamiento del fragmento intrón+antisentido (INDR). Se digirió ambos vectores con las endonucleasas de restricción NotI y BglII. En el caso del vector pGEM INDR se liberó un fragmento de 736 pb (correspondientes a 164 pb del intrón y 572 pb. del fragmento de *hma1*) del mientras que en el caso del vector pGEM IZ solamente se linearizó. Ambos productos fueron purificados y se procedió a ligarlos obteniéndose así el vector pGEM IZINDR que ya contiene el RNAi (Figura 12). Este fue subclonado al vector de expresión inducible para plantas, pER8, cortando ambos vectores con la endonucleasa SpeI y realizando luego la ligación (Figura 12).

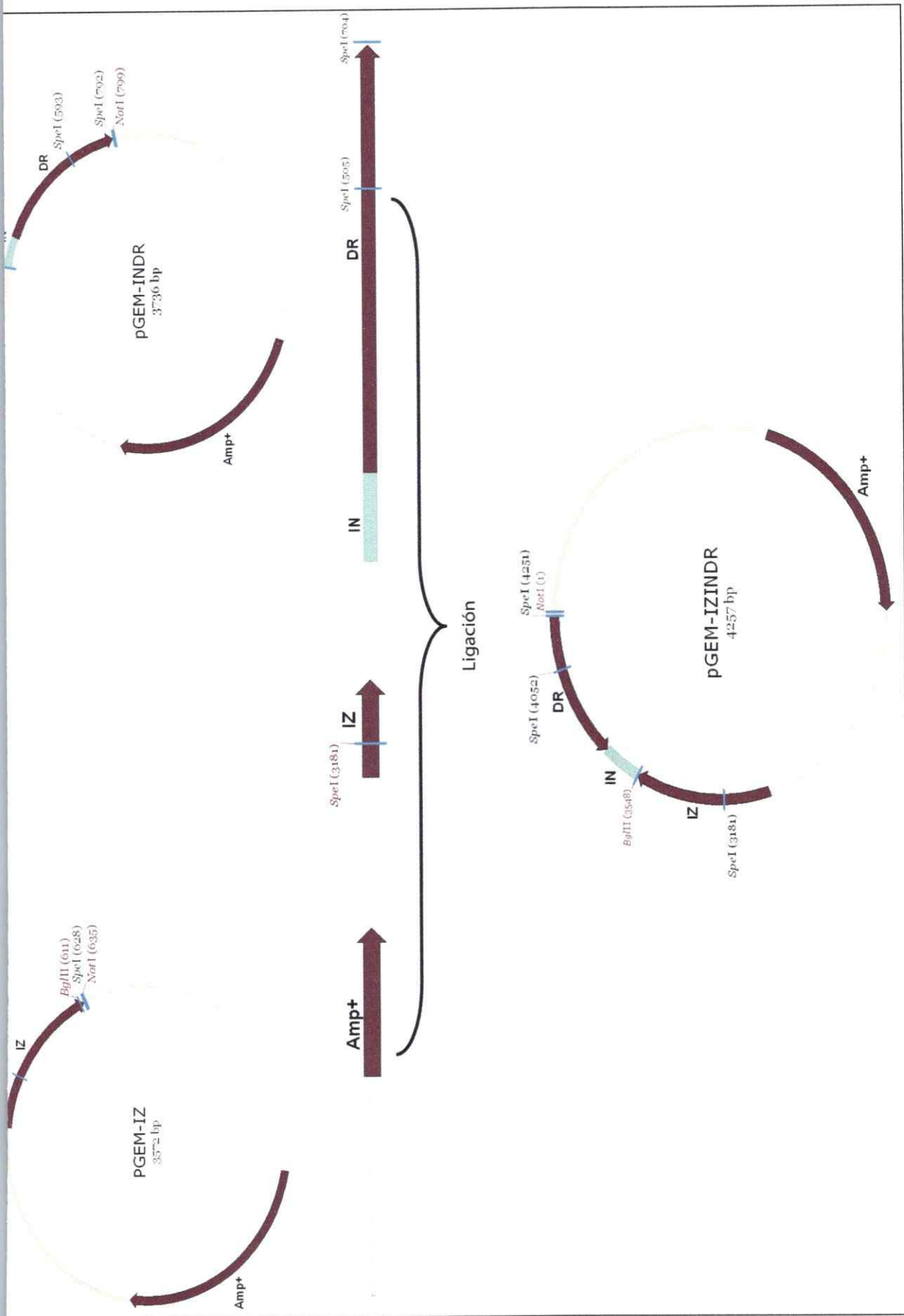


Figura 11. Estrategia de clonación del constructo silenciador. En esta figura se muestra los últimos pasos para obtener el constructo silenciador entero. Primero se digirieron los vectores pGEM-INDR y pGEM-IZ con las enzimas de restricción NotI y BglII. Se purificaron los fragmentos necesarios y se realizó una reacción de ligación, de esta forma se obtuvo el vector pGEM-IZINDR.

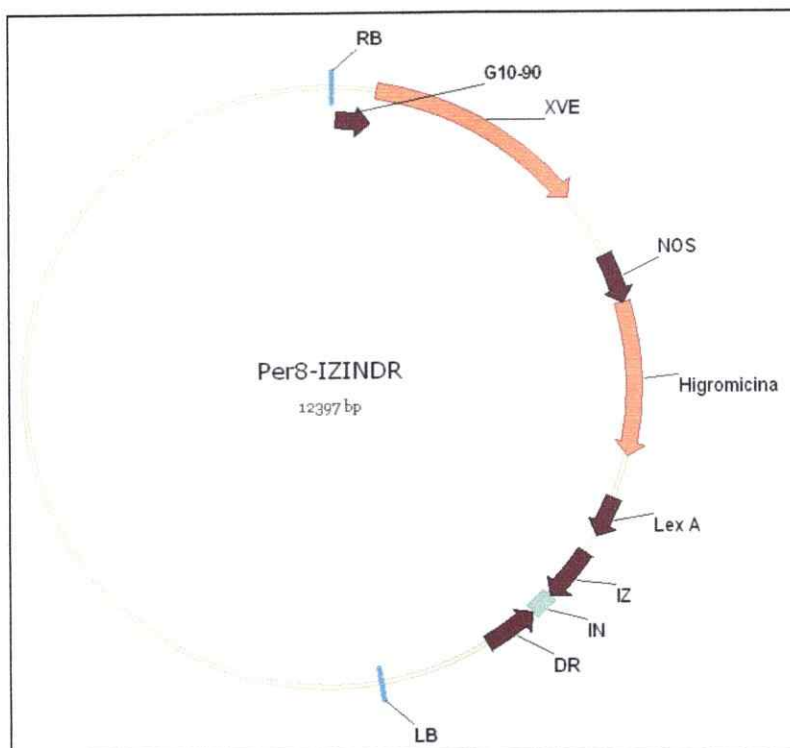


Figura 12. Vector binario Per8-IZINDR. Este vector fue el obtenido al clonar el constructo en el vector Per8, y el cual se utilizó para transformar generar el silenciamiento de *hmal* en *Arabidopsis thaliana*.

3.26 Subclonamiento de IZ y INDR en el vector pGEM®-T.

Debido a que en los PCR se usó una polimerasa de ADN sin actividad correctora, los amplificados presentan las colas de Adenina necesarias para su subclonamiento en el vector comercial pGEM®-T. Los amplificados IZ y INDR fueron insertados en pGEM®-T a través de una reacción de ligación de ADN, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del vector.

Los vectores pGEM®-IZ y pGEM®-INDR fueron introducidos en la cepa bacteriana *E. coli* DH5α según lo describe Sambrook y col. (1989). En forma simplificada, el procedimiento consta de tres partes: 1) preparar células competentes de *E. coli* (Sambrook y col., 1989), es decir preparar células para que puedan ser transformadas con ADN plasmidial. 2) Una vez preparadas las células

competentes, éstas son transformadas con los plasmidios de interés mediante una incubación con el ADN que involucra un shock térmico. 3) Las bacterias transformantes son seleccionadas en medio con antibióticos (ampicilina en el caso de transformación con pGEM[®]-T) y también por la pérdida de la actividad β -galactosidasa asociada a la inserción del inserto en el vector pGEM[®]-T.

3.27 Corte del constructos INDR desde pGEM[®]-T y ligación al vector pGEM[®]-IZ

El constructo INDR fue cortado desde el vector pGEM-INDR utilizando el sitio de corte NotI presente en el vector y BglII presente en el constructo. Paralelamente se trato el vector pGEM[®]-IZ con las mismas enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN y el vector abierto fueron cortados y separados electroforéticamente del resto del ADN plasmidial, fueron purificados desde los geles de agarosa de electroforesis utilizando el kit ADN extraction Kit, Ferementas. Los fragmentos purificados se ligaron.

Todos los procedimientos de manipulación de ADN se realizaron según lo descrito por Sambrook y col., (1989).

3.28 Transformación genética estable de *Arabidopsis thaliana*

El vector binario pER8 RNAi fue utilizado para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* según lo describe Nilo (2002).

Las bacterias fueron crecidas en medio LB-Agar con los antibióticos gentamicina, rifampicina y spectinomocina.

Las bacterias que contenían el ADN plasmidial, fueron utilizadas para transformar plantas de *A. thaliana* en forma estable.

Las *Arabidopsis thaliana* fueron transformadas siguiendo el procedimiento de inmersión floral descrita por Clough y Bent (1998):

Las plantas se crecieron hasta la etapa de floración (4-5 semanas de edad), estas se sumergieron por 15 segundos en una solución que contiene el *Agrobacterium tumefaciens* (que contiene el vector binario) crecido hasta una D.O.₆₀₀~0,8, sacarosa 5% y el surfactante Silwet L-77 0,05%. Luego de la inmersión floral, las plantas fueron colocadas en posición horizontal en una bandeja húmeda e incubadas en oscuridad por 16 horas. Finalmente, las plantas fueron enderezadas y trasladadas a una cámara de cultivo con fotoperíodo 16/8 h. donde se siguieron regando por 3 semanas y luego se dejaron secar para obtener sus semillas.

Para seleccionar las plantas transformantes las semillas fueron esterilizadas y luego sembradas en medio MS 0,5X/Agar 0,8% con el antibiótico hygromicina (20 µg/ml) y se crecieron a un fotoperíodo 16/8 h. a 25°C por 15-20 días, luego de ese período se pudo observar las diferencias en crecimiento.

3.29 Inducción del silenciamiento en placas.

La inducción se llevó a cabo tanto por la germinación en placas con 20 µM de inductor o mediante el trasplante desde un medio sin inductor a un medio con 20 µM de inductor.

3.30 Fraccionamiento subcelular de *A. thaliana*.

Debido a que la biomasa es un factor limitante para realizar ensayos bioquímicos en *Arabidopsis*, el fraccionamiento se realizó en plantas crecidas en medio líquido durante 15 días, de esta forma uno puede obtener mayor biomasa de forma sencilla. La biomasa de *Arabidopsis thaliana* obtenida fue homogeneizada en un volumen similar de sacarosa 0,5 M; KH₂PO₄ 0,1 M, pH 6,65; MgCl₂ 5 mM. Este

homogenizado se filtró a través de Miracloth reteniendo los restos sólidos. El homogeneizado se centrifugó a 1.000g durante 2 minutos y el sobrenadante fue colocado sobre un colchón de sacarosa 1,3 M. Luego de una centrifugación a 100.000g por 90 minutos, la fase superior del volumen fue removido y sobre la interfase membranosa se colocaron 7,5 ml de sacarosa 1,1 M y sobre ésta 7,5 ml de sacarosa 0,25 M. De esta forma se formó un gradiente discontinuo de sacarosa de tres etapas: sacarosa 1,3 M/ 1,1 M/ 0,25 M (Fig.10). El gradiente fue centrifugado a 100.000g por 100 minutos y posteriormente se colectó la interfase entre 0,25 M/ 1,1 M la cual diluyó a la mitad con agua, se mezcló y luego se centrifugó durante 50 minutos a 100.000g precipitando las vesículas. El pellet obtenido fue resuspendido en buffer STM (sacarosa 0,25 M, TRIS 50 mM y $MgCl_2$ 25 mM).

3.31 Determinación de proteínas en fracciones subcelulares

Para la determinación de proteínas se utilizó el método del ácido Bicinchonínico (BCA) (Bollag y Edelstein, 1993c). Las muestras se llevaron a un volumen de 20 μ l con el tampón STM y se agregaron 180 μ l de una mezcla 50:1 del reactivo A (Na_2CO_3 2%; $NaHCO_3$ 0,95%; Tartrato de Na 0,16%; BCA 1%; NaOH 0,4 %) y el reactivo B ($CuSO_4$). Luego, las muestras se incubaron a 37° durante 30 minutos y se determinó su absorbancia a 560 nm. Como estándar se empleó seroalbúmina de bovino.

3.32 Aislamiento de protoplastos desde *A. thaliana*

Se tomaron cuatro hojas en buen estado de *A. thaliana* que fueron cortadas en tiras de 1 mm. de ancho y sumergidas en una solución de enzimas (1,5 % celullase (sigma), 0,4% pectinase de aspergillus nigger (sigma), 0,4 M manitol y 20 mM KCl). Luego esta solución enzimática fue colocada en vacío durante 30 minutos para permitir la penetración de estas en el tejido vegetal. Se dejó actuar a estas

enzimas durante 12 horas a temperatura ambiente y sin agitación, y la solución fue pasada a través de un filtro de nylon con un poro de 50 μm . La solución filtrada fue centrifugada a 600 g por 2 minutos y los protoplastos obtenidos fueron lavados 3 veces con una solución de 20 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES, pH 5,7 y 0,4 M manitol y luego resuspendidos en la misma solución. Finalmente, se procedió a contar los protoplastos obtenidos de manera de preparar soluciones de 10^5 protoplastos/ml. En el conteo se incluyeron solo protoplastos en buen estado, como el mostrado en la Figura 13, el cual esta visto con un zoom de 600X.

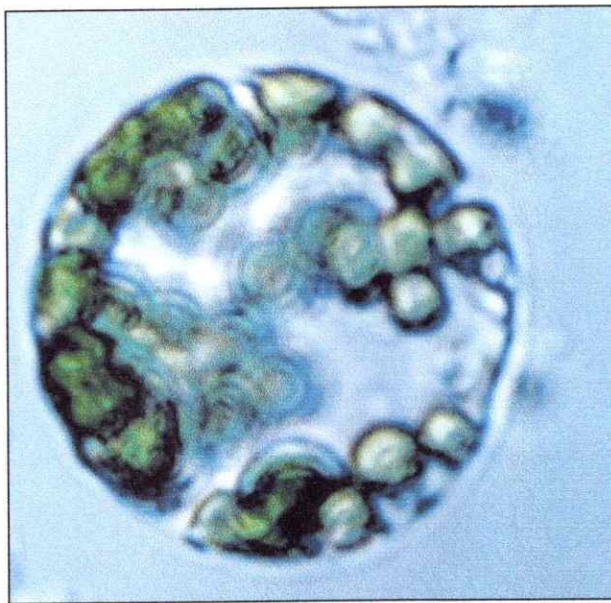


Figura 13. Fotografía de protoplasto obtenido . Fotografía de un protoplasto visto en un microscopio con un aumento de 600X. Se observa que su membrana esta integra. En verde se observan los cloroplastos.

3.33 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes

Las muestras a analizar se prepararon mezclándolas con 1 volumen de tampón de corrida 2X que contiene Tris 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% y β -mercaptoetanol 50 mM. En el caso de las fracciones proteicas insolubles, éstas se resuspendieron directamente en 50

μ L de tampón de corrida. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min antes de cargar los geles. Los geles de poliacrilamida fueron preparados de acuerdo a Laemmli y col. El gel concentrador es al 4,5% de acrilamida:bisacrilamida (30:1) en Tris 0,125 mM (pH 6,8), SDS 0,1%, TEMED 0,1% y persulfato de amonio al 0,13%. El gel separador es al 12% o 15% de acrilamida:bisacrilamida (30:1), en Tris 0,375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%, TEMED 0,25% y persulfato de amonio al 0,037%. El tampón de corrida corresponde a Tris-glicina. (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, pH 8,3). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 a 110 voltios hasta que el frente de corrida salió del gel. Como patrón de tamaños moleculares se utilizó el estándar de Fermentas, *PageRuler Prestained Protein Ladder* que incluye tamaños de proteína de 11 KDa hasta 170 KDa.

3.34 Medición de los niveles de calcio en plántulas de *A. thaliana*.

Para obtener los valores de la concentración de calcio en plántulas se procedió de la siguiente manera. Semillas de *A. thaliana* que expresan el gen de la Aequorina fueron sembradas en medio MS sólido, en el interior de tubos de medición. Se dejó crecer las plántulas durante 6 días.

Las plántulas fueron incubadas durante ~16 horas en oscuridad, con una solución 3 μ M de Coelenterazina. Luego se comenzó con la medición de los niveles de luminiscencia. El estímulo frío se realizó agregando 200 μ l de agua a 4°C.

3.35 Medición de los niveles de Calcio en protoplastos de meristema de *A.thaliana*.

Para realizar estas mediciones se procedió con el aislamiento de protoplastos desde hojas de *A. thaliana* que expresan el gen de la Aequorina. Se utilizó 10^5 protoplastos, los cuales fueron incubados durante 2 horas en una solución con Coelenterazina cuya concentración final fue de 3 μ M. Luego se

comenzó la medición de luminiscencia. El estímulo frío se realizó mediante la inyección de 20 µl de agua a 4°C.

3.36 Calibración de los registros de luminiscencia en concentraciones de Ca²⁺

En las plántulas que contienen la aequorina activa, existe una relación doble logarítmica entre la concentración de calcio libre y el monto de aequorina que aún no es consumida en cualquier punto en el tiempo (Blinks y col. 1978). Al final de cada registro de luminiscencia, el monto total de aequorina en las plántulas fue consumido tras la adición de 0,5 ml de CaCl₂ 2M /etanol 20% sobre las muestras. La razón entre el máximo de luminiscencia producido en respuesta a una determinada estimulación y la luminiscencia total producida por las moléculas de aequorina es convertida a concentraciones de Ca²⁺ utilizando la curva de calibración descrita previamente por Allen y col., (1977) utilizando la ecuación que se muestra abajo.

$$[Ca^{2+}] = \frac{\{(L_0/L_{max})^{1/3} + [KTR(L_0/L_{max})^{1/3}] - 1\}}{\{KR - [KR(L_0/L_{max})^{1/3}]\}}$$

Ecuación 1. Ecuación de la curva de calibración utilizada para la transformación de la luminiscencia a concentraciones de Ca²⁺.

L₀ es la luminiscencia por segundo.

L_{max} es la cantidad total de luminiscencia presente en la muestra durante el curso del experimento.

[Ca²⁺] es la concentración de calcio calculada.

KR es la constante de disociación para el primer ion calcio unido a aequorina,.

KTR es la constante de unión para el segundo ion calcio que se une a la fotoproteína. Los valores de KR y KTR utilizados fueron 2 x 10⁶ M⁻¹ y 55 M⁻¹, respectivamente.

Estas constantes fueron calculadas por van der Luit y col. (1999).

4 Resultados

Para realizar el silenciamiento de HMA1 se utilizó la técnica de RNA interferencia (Fire y col. 1999; Agrawal y col. 2003). Para lograr esto se diseñó y generó un constructo génico que al ser expresado generará un RNA de doble hebra. El constructo posee un fragmento de la secuencia de HMA1 en orientación sentido y luego el mismo fragmento en orientación antisentido, de manera que al ser transcrito tendría secuencias complementarias. Estos dos fragmentos están separados por un intrón, de esta forma se generara una horquilla, la que es procesada eliminando el intrón (Mansoor y cols. 2006). Esta arquitectura del RNA interferencia es la que ha mostrado mayor eficiencia llegando a silenciar genes en un 90-100% (Mansoor y cols. 2006). Además, este constructo fue clonado bajo el control de un promotor inducible por estradiol (Chua y col. 2003) para de esta manera tener un control del silenciamiento, con el fin de minimizar el tiempo de adaptación de *A. thaliana* a la falta de esta proteína.

4.1 Aislamiento de secuencias y clonamiento en el vector pGEM-T®.

4.1.1 Amplificación del fragmento de *hma1* antisentido (DR).

El fragmento de *hma1* fue obtenido por amplificación por PCR utilizando como templado el cADN completo de *hma1* (At4g37270) donado por Riken (Japón). Para esto se utilizó los partidores *Fhma1* y *trihib2 F* los que amplifican un fragmento de 572 pb, al cual en adelante llamaremos DR (Figura 14). Este fragmento amplificado corresponde a una zona central del CDS, y fue seleccionada a partir de un análisis bioinformático que mostró una baja similitud con otros CDS del genoma de *A. thaliana*.

La obtención del fragmento sentido (IZ) corresponde a este mismo fragmento pero con una orientación contraria.

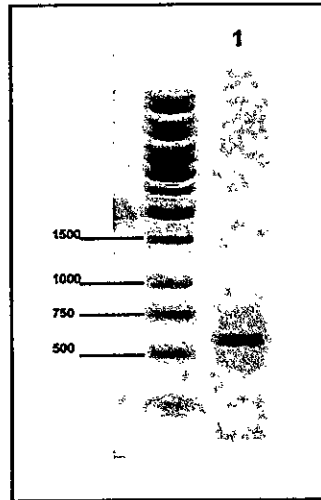


Figura 14. Amplificación del fragmento DR del gen *hma1*. Electroforesis de ADN en 1% Agarosa. En el carril 1 se cargo 2 μ l de la reacción de PCR del fragmento de 572 pb del gen *hma1*. Marcador de peso molecular: ladder de 1Kb.

4.1.2 Amplificación del intrón de la actina 11 desde ADN genómico.

El intrón utilizado como separador de los fragmentos sentido y antisentido del gen *hma1*, fue amplificado desde el ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* a través de una reacción de PCR utilizando los partidores *Fintron* y *Rintron*. Enseguida fue reamplificado pero utilizando los partidores *Trihib2 F* y *trihib3 R*, para así agregarles tanto la “punta” de *hma1* sentido y la “cola” de *hma1* antisentido, esperando una banda de 162pb (Figura 15).

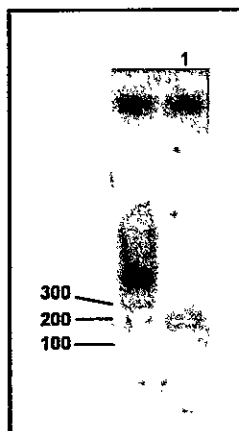


Figura 15. Amplificación del intrón. Electroforesis de ADN en Gel 2% Agarosa. En el carril 1 se cargo 2 μ l de la reacción de PCR realizada para amplificar el intrón. Marcador de peso molecular. Ladder 100 pb.

4.1.3 Fusión del intrón y el fragmento de hma1 antisentido (DR).

Para lograr la fusión se utilizó la técnica de PCR traslapado (ver materiales y métodos) a través del cual se obtiene el constructo INDR listo para ser clonado. El fragmento que se obtiene es de 734 pb (Figura 16).

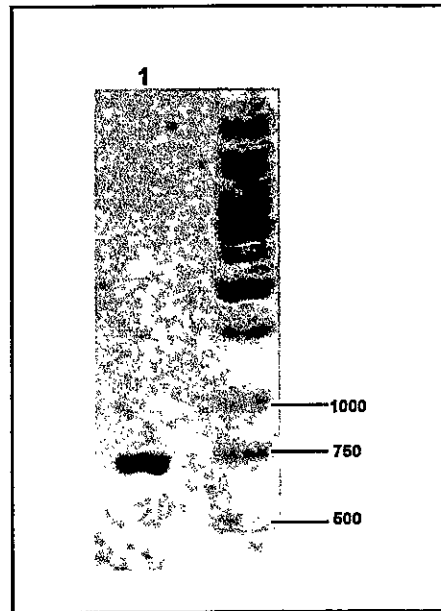


Figura 16. Fusión del intrón (IN) con el fragmento antisentido de *hmal* (DR). Electroforesis de ADN en Gel 1% Agarosa. En el carril 1 se cargo 2 μ l de la reacción de PCR traslapado realizado para fusionar el intrón y el fragmento DR. Marcador de peso molecular: ladder de 1Kb.

4.1.4 Clonamiento en pGEM-T[®] del fragmento IZ y del fragmento INDR.

El fragmento INDR obtenido por PCR traslapado fue clonado en el vector pGEM-T[®] (siguiendo las instrucciones del fabricante).

Para comprobar que hubo clonación de los fragmentos deseados, se realizó una reacción de PCR con los partidores del vector T7 y Sp6, lo que amplifica todo lo que se encuentra clonado en el sitio poli-T, así esperamos en el caso del vector pGEM-T[®]-INDR un amplificado de 918 pb mientras que en el vector pGEM-T[®]-IZ un amplificado de 673 pb (Figura 17B).

Para verificar la dirección con la cual se ligaron los fragmentos, se procedió a cortar con enzimas de restricción (ver materiales y métodos). Los vectores pGEM-T[®]-INDR y pGEM-T[®]-IZ fueron cortados con la enzima *SpeI* lo que debería liberar un fragmento de 199 pb y 506 pb respectivamente

(Figura 17A).

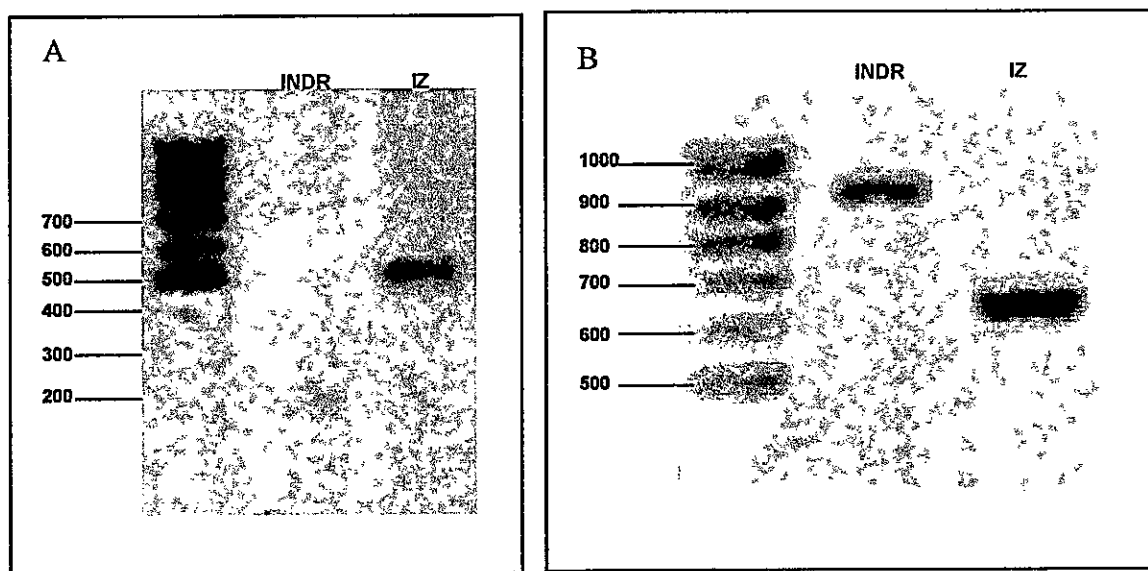


Figura 17. Digestión con enzimas de restricción y amplificación del fragmento INDR e IZ . Geles 1% Agarosa. A Digestión de los vectores pGEM-T-INDR y pGEM-T-IZ con la enzima de restricción *SpeI*. B Amplificación por PCR de los vectores pGEM-T-INDR y pGEM-T-IZ utilizando los partidores T7 y Sp6 que se unen al vector en los extremos del constructo introducido. Marcador de peso molecular: A) ladder de 100 pb, B) ladder 1Kb.

4.2 Subclonamiento del fragmento INDR en pGEM-T®-IZ y generación del vector binario pER8-IZINDR.

4.2.1 Subclonamiento del fragmento INDR en pGEM-T®-IZ.

Los vectores pGEM®-IZ y pGEM®-INDR fueron tratados con las enzimas de restricción *BglIII* y *NotI*. En el caso del vector pGEM-T®-IZ obtenemos su linearización mientras que en el vector pGEM®-INDR se obtiene la liberación de un fragmento de 710 pb. En ambos casos se realizó la separación a través de un gel de agarosa seguido de la purificación de los fragmentos de ADN (ver materiales y métodos). Una vez purificadas los fragmentos se procedió con el protocolo de ligación

entre ambos (ver materiales y métodos). Para comprobar que se generó el constructo deseado se digirió con la enzima de restricción *SpeI* la que corta dos veces en el constructo liberando un fragmento de 871 pb y el resto del vector 3386 pb (Figura 18). Además se secuenció el constructo obtenido (datos no mostrados).

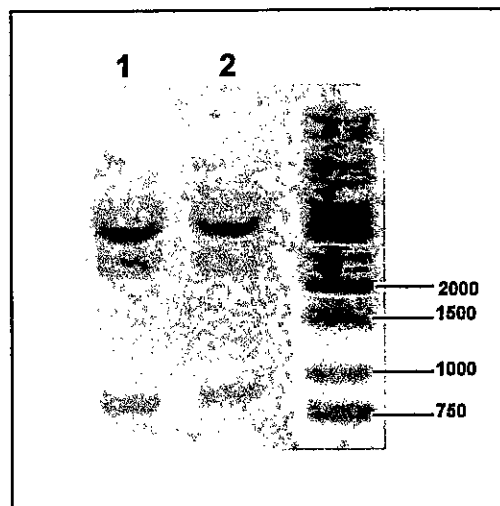


Figura 18. Digestión del vector pGEM-T-IZINDR. Electroforesis de ADN en Gel de agarosa 1%, en la línea 1 y 2 corresponden a dos vectores obtenidos como resultado de la ligación, en estas se puede observar la banda de ~871 pb que se liberan del vector al ser digerido con la enzima de restricción *SpeI*. Marcador de peso molecular: ladder de 1Kb.

4.2.2 Subclonamiento en el vector binario pER8.

Para realizar el subclonamiento del constructo génico en el vector binario se purificó el vector pGEM-T®-IZINDR desde la bacteria *E. coli*, cepa DH5 α utilizando un kit de purificación de ADN plasmidial (ver materiales y métodos). Este ADN fue digerido con la enzima de restricción *SpeI* y se purificó la banda de 871 pb (correspondientes a 141 del intrón y 365 de cada fragmento de *hma1*), la cual corresponde al constructo. Paralelamente se digirió el vector pER8 con la misma enzima de restricción lo que lo lineariza (ver Figura 6).

Una vez purificado el constructo, se realizó una reacción de ligación entre este y el vector linearizado, y con el resultado de esta reacción se transformó la bacteria *E. coli*.

Para comprobar la ligación se purificó el vector binario generado y se digirió con la misma enzima de restricción (*SpeI*), lo que liberó la banda de 871 pb (Figura 19A). Para asegurarnos aún más del éxito de la ligación, se procedió a digerir el vector con la enzima de restricción *BglII* la cual corta en el constructo y en el vector (ver Figura 12), lo que provoca dos bandas de 9015 y 3382 pb (Figura 19B).

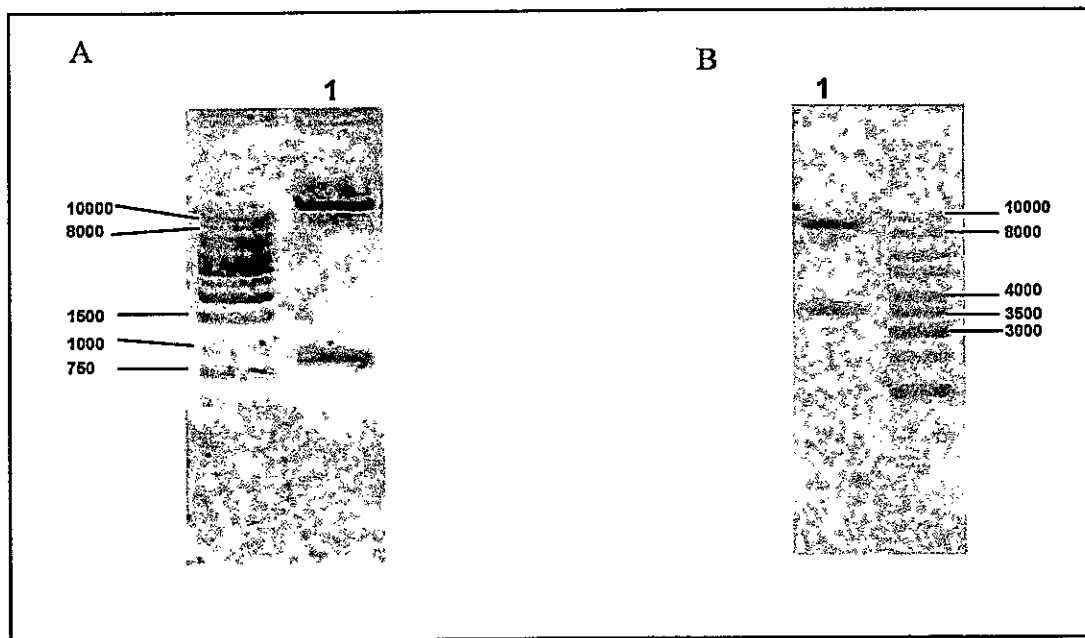


Figura 19. Comprobación del vector pER8-IZINDR por digestión con enzimas de restricción. A. La digestión se realizó con la enzima *SpeI*, se ve claramente la banda de ~871 pb. B La digestión se realizó con la enzima de restricción *BglII*, se observa una banda de ~3400 y otra de ~9000. Marcador de peso molecular: ladder de 1Kb.

4.3 Transformación de *A. thaliana* con el vector binario pER8-IZINDR.

Con el fin de obtener plantas silentes en *hmal*, se transformó *Agrobacterium tumefaciens* con el vector pER-IZINDR para luego poder transformar plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* mediante la técnica de inmersión floral utilizando esta bacteria (ver materiales y métodos). Una vez transformado

A. tumefaciens, se corroboró la clonación de pER8-IZINDR mediante purificación del vector seguido por digestión con enzimas de restricción.

Una vez obtenido el vector binario se procedió a transformar las líneas de *A. thaliana* que se utilizarán, estas son la línea "wildtype", y las líneas que expresan la proteína bioluminiscente Aequorina (*AeqCitosolica* y *AeqGolgi*). Esto se realizó mediante inmersión floral (Clough y cols 1998) usando *A. tumefaciens* que contiene el vector binario. Las semillas producidas fueron esterilizadas y sembradas en medio MS en presencia de los antibióticos (Hyg 20 µg/ml en caso de la "wildtype" y en Hyg 20 µg/ml + Kan 20 µg/ml en los casos con Aequorina). La selección se llevó a cabo 15 días post germinación (figura 20). Una vez transcurrido este tiempo las plántulas sensibles se mostraban de tamaño reducido, con su primer par de hojas enroscadas y/o ausentes, y su segundo par de hojas verdes. Por otra parte, las plántulas resistentes presentaban un mayor crecimiento con respecto a las sensibles y con todas sus hojas verdes como se observa en la Figura 20.



Figura 20. Selección de plantas resistentes a hygromicina. Las semillas de plantas de *Arabidopsis thaliana* (wt., *AeqCitosolica* y *AeqGolgi*) fueron sembradas en medio MS sólido que posee 20 µg/ml del antibiótico hygromicina. Se observa claramente la diferencia entre plantas resistentes y sensibles.

4.4 Comprobación de plantas transgénicas.

Para comprobar que las plantas seleccionadas fueran realmente transgénicas, y que incorporaron el T-ADN que contiene el constructo, se procedió a extraer ADN genómico y realizar un PCR con partidores específicos para el gen que les otorga la resistencia a Hygromicina (partidores *HygF* y *HygR*). Desde el ADN de plantas transgénicas deberíamos obtener un amplificado de aproximadamente 410 pb, mientras que no deberíamos obtener amplificado desde el ADN de plantas no transgénicas, lo que se puede observar claramente en la Figura 21. Las líneas 1, 2 y 3 corresponden a plantas "wildtypes" transformadas con el constructo de silenciamiento que incorporaron el ADN exógeno.

Para cada línea transformada se calculó la tasa de transformación, estas tasas fueron de 1,5% 1,8% y 1,9% para las líneas padres wiltype, *cytAeq* y *golAeq* respectivamente.

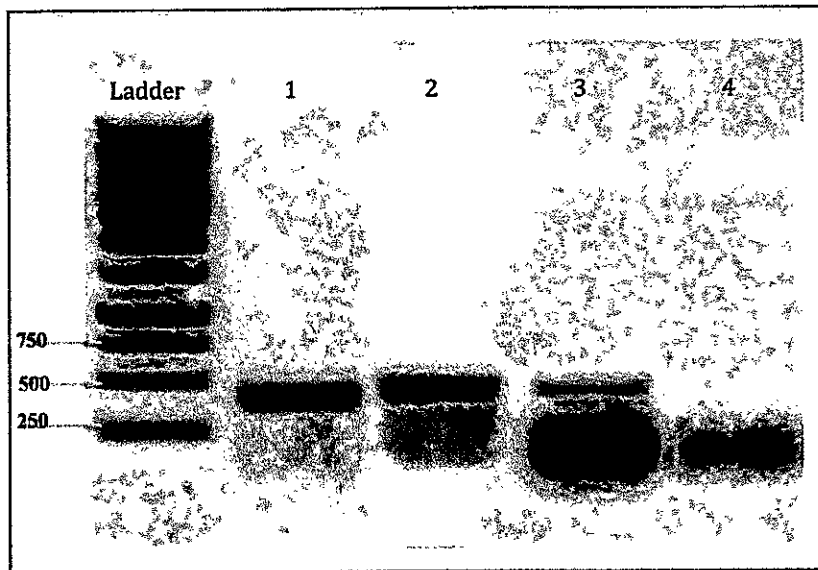


Figura 21. Amplificación del gen que confiere la resistencia a hygromicina en plantas seleccionadas como transgénicas. Electroforesis de ADN en Gel de agarosa 1%. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a plantas diferentes a las cuales se les extrajo ADN geonómico y luego se amplificó desde ese ADN utilizando partidores específicas para el gen de resistencia a la Hygromicina codificado en el T-ADN. Carril 4 corresponde al control negativo (wild-type no transformada). Marcador de peso molecular: ladder de 1Kb.

Para el análisis del silenciamiento se utilizó solamente las plantas transgénicas provenientes de la línea wildtype, y así demostrar que el constructo tiene la capacidad de silenciar *hmal*.

4.5 Comprobación del silenciamiento en las plantas transgénicas.

Con el fin de comprobar el silenciamiento de *hmal* en las líneas sometidas a transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, se sembraron dichas plantas en medio MS+ β -estradiol (ver materiales y métodos), de esta forma logramos que se induzca la expresión del RNAi. Estas plantas fueron crecidas durante 15 días en presencia del inductor estradiol, y luego se les extrajo RNA (ver materiales y métodos). Este RNA fue cuantificado para luego utilizar igual concentración como templado para la síntesis de cADN (ver materiales y métodos). Una vez obtenido el cADN se realizó una reacción de PCR con partidores específicos para *hmal* y para *actina*, y de esta forma determinar si el RNAi está silenciando la expresión de *hmal*. En la Figura 22 se muestran tres líneas de plantas transgénicas. En una de ellas (carril 3 Figura 22) se observó un silenciamiento alto, estos resultados fueron preliminares, sin embargo en resultados posteriores se han encontrado más líneas silentes y demostrado esto mediante PCR de tiempo real. Estos resultados posteriores han mostrado que todas las líneas analizadas (6 líneas) generan un grado de silenciamiento el que varía entre un 10 a un 80% (Ordenes, comunicación personal).

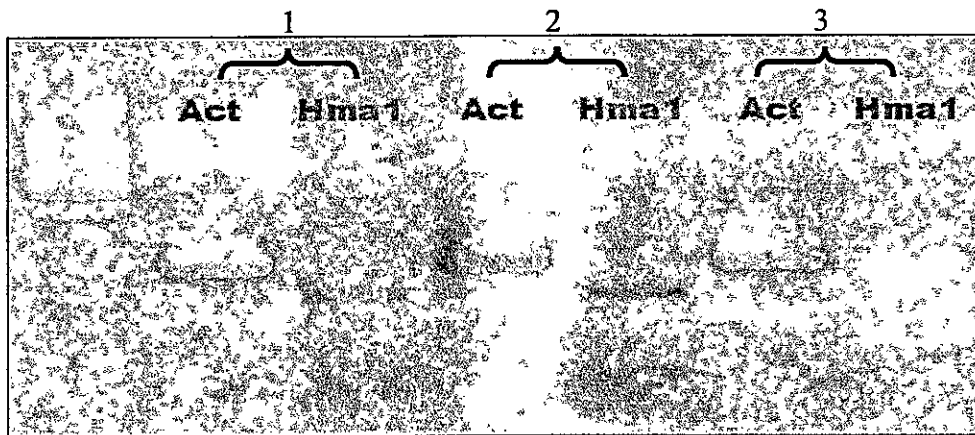


Figura 22. Comprobación de silenciamiento obtenido en plantas inducidas. Se muestra la amplificación del gen *hma1* a partir de hojas de tres líneas trasngénicas (1, 2 y 3) crecidas en medio MS sólido en presencia del inductor. La concentración de RNA utilizada en cada caso para la síntesis de cDNA fue la misma. Como control se amplificó un fragmento del gen de actina utilizando partidores específicos para *A. thaliana*.

4.6 Análisis de la expresión de *hma1* en diferentes tejidos

Para determinar la expresión tejido específico de *hma1*, se extrajo RNA desde distintos tejidos de una planta “*wildtype*” y con igual concentración de RNA se sintetizó cADN del cual se amplificó *hma1* con partidores específicos, los resultados presentados en la Figura 23 sugiere una expresión preferencial en los tejidos verdes, y una baja expresión en la raíz.

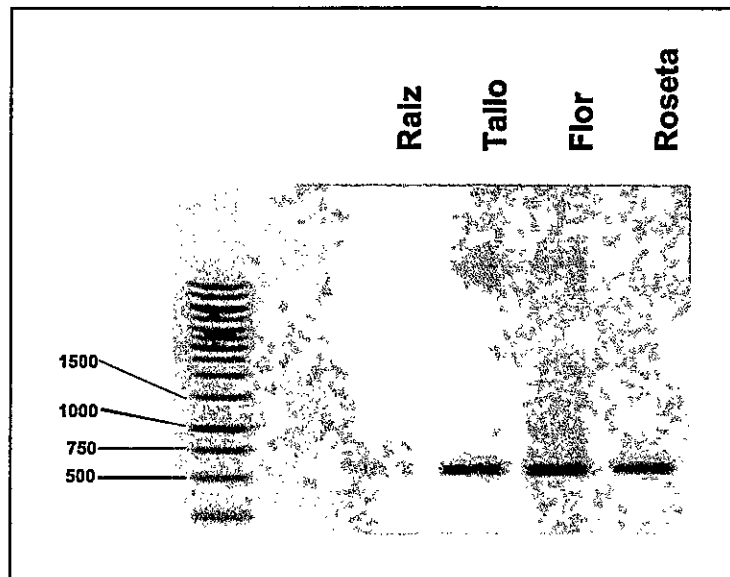


Figura 23. Expresión diferencial de *hma1* en distintos tejidos de *Arabidopsis thaliana*. Se procedió a extraer RNA de diferentes tejidos de una planta y con esto observar la concentración relativa del mRNA de *hma1* en cada tejido.

Los resultados obtenidos muestran que la estrategia seguida para generar plantas silentes fue exitosa obteniéndose plantas “*wildtype*” con silenciamiento inducible.

En el caso de las líneas que expresan la proteína bioluminiscente, es necesario comprobar que ésta esté correctamente destinada a los organelos y además es necesario de implementar la medición de la concentración de calcio mediante la aequorina en el laboratorio.

4.7 Topología de la apoproteína Aequorina en el aparato de Golgi.

Para poder observar las fluctuaciones de calcio en el aparato de Golgi es importante que la proteína Bioluminiscente, Aequorina, que fue destinada al aparato de Golgi esté hacia el lumen del organelo. Para determinar esto se realizó un análisis de topología. Este análisis consiste en tratar

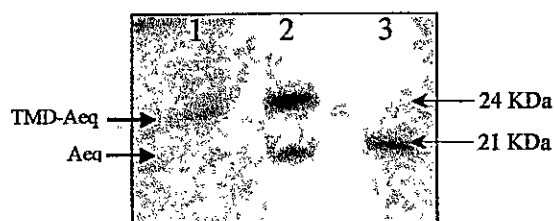


Figura 24. Western blot con anticuerpos monoclonales específicos para la proteína aequorina en vesículas del aparato de Golgi. 1. Vesículas. 2. Vesículas tratadas con tripsina. 3. Vesículas permeabilizadas con Triton X-100 y tratadas con tripsina.

vesículas del organelo con la proteasa Tripsina (Sigma), en condiciones de permeabilización (tratadas con triton X100) o en condiciones normales. Luego estas vesículas son utilizadas para un western blot con anticuerpos monoclonales específicos para la proteína de interés, en este caso Aequorina (figura 24).

En la figura 24 se ve diferencias en los pesos moleculares de las proteínas detectadas por el anticuerpo anti-Aeq, estas diferencias ocurren al permeabilizar las vesículas con tritón X100. Esto nos sugiere que la proteína híbrida TMD-Aeq está al interior de las vesículas, lo que impide que la tripsina actúe sobre ella, sin embargo al permeabilizar las vesículas, la tripsina es capaz de ingresar y digerirla, provocando el cambio del peso molecular.

4.8 Análisis de la fluctuación en la concentración de Calcio

Para determinar el papel que tiene Hma1 en la homeostasis de calcio es importante conocer como varía la concentración de calcio in planta. Para esto se utilizaron técnicas de luminometría en plantas que expresan la proteína bioluminiscente Aequorina (ver introducción). Para esto es necesario

primeramente caracterizar la variación de la concentración del calcio en el citosol y en el aparato de Golgi de plantas "wildtype", para en un futuro ser comparada con plantas silentes en hma1. El estímulo abiótico utilizado para provocar la variación en la concentración de calcio fue el frío, ya que se ha visto que este genera una gran variación en la concentración de Calcio citosólico y además se han estudiado dichas variaciones en el aparato de Golgi (Ordenes, V. Datos no publicados).

En primer lugar se determinó la variación de la concentración de Calcio citosólico en protoplastos de tejido meristemático de *A. thaliana* (n=4) (Figura 25). Se observó una variación en la concentración de Calcio tal como se ha descrito con anterioridad en plántulas de *A. thaliana* (Knight y cols, 1996). Esta variación se caracteriza por un aumento rápido e instantáneo de la concentración de calcio en el citosol, seguido de un regreso al nivel inicial con una cinética más lenta el cual tarda 10 minutos aproximadamente. Se ha visto en plántulas que el tiempo de duración total de la variación es de 1 minuto aproximadamente, sin embargo en protoplastos se ve que la duración es mayor demorando 10 minutos aproximadamente. Esta prolongación de la señal puede deberse al sistema en estudio, al ser esta una solución, el estímulo genera una distorsión del sistema provocando una variación en las presiones lo que a su vez puede estar sometiendo a los protoplastos a diversos estímulos.

**[Ca²⁺] Cytosolico en protoplastos de
Arabidopsis thaliana en respuesta al frío**

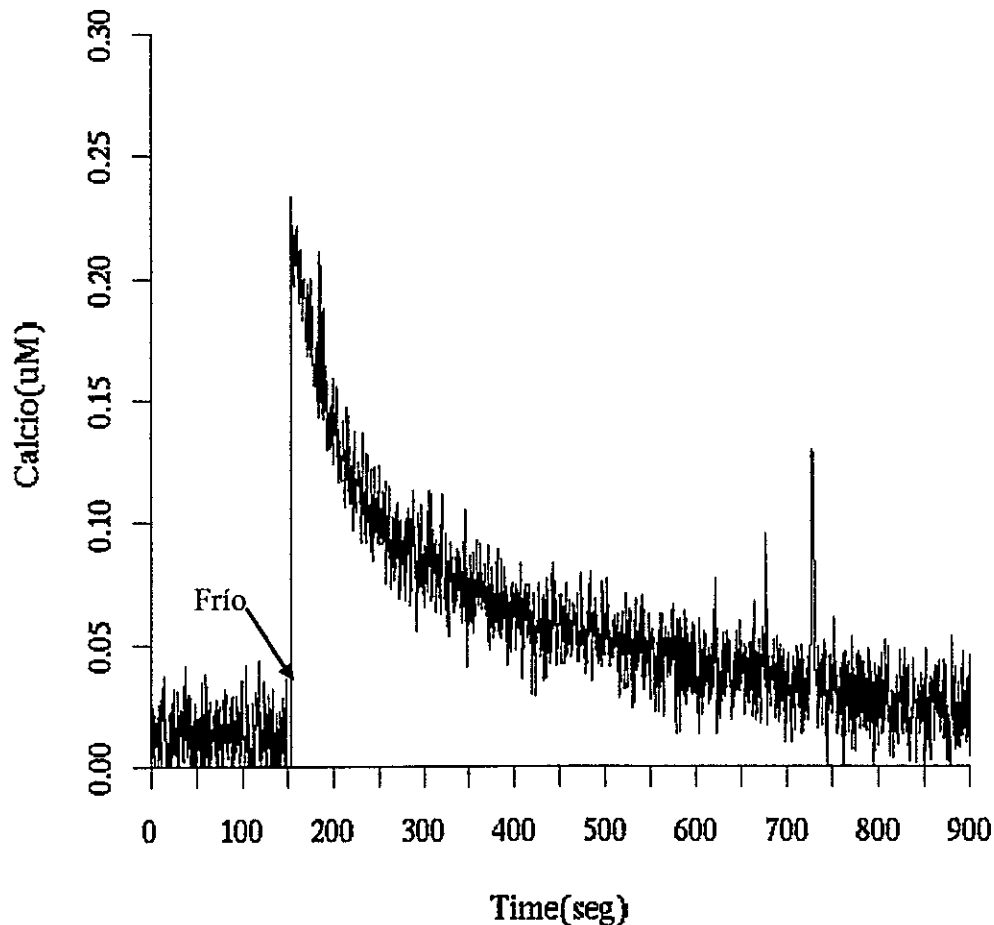


Figura 25. Variación en la concentración de Calcio citosólico característica en protoplastos frente a un estímulo frío. La gráfica muestra como es la variación de calcio libre en el citosol de protoplastos al someterlos a 4°C.

Posteriormente, se repitió la estrategia experimental para caracterizar la variación de la concentración de Calcio en el aparato de Golgi utilizando protoplastos que poseen la Aequorina destinada al aparato de Golgi (n=3) (Figura 26), ya que como se mencionó anteriormente se piensa que HMA1 estaría actuando en la restauración del nivel de calcio citosólico mediante el transporte de este hacia el lumen del aparato de Golgi (Ordenes, V. datos no publicados).

Los resultados observados concuerdan con los observados por Ordenes y col., tanto en la cinética como en la duración de la variación en el nivel de Calcio. Como podemos ver en la Figura 26, el aumento en el Calcio libre en el aparato de Golgi no es un aumento instantáneo. Por otra parte el aumento en los niveles de Calcio es prolongado y demora aproximadamente 10 minutos en alcanzar la concentración máxima.

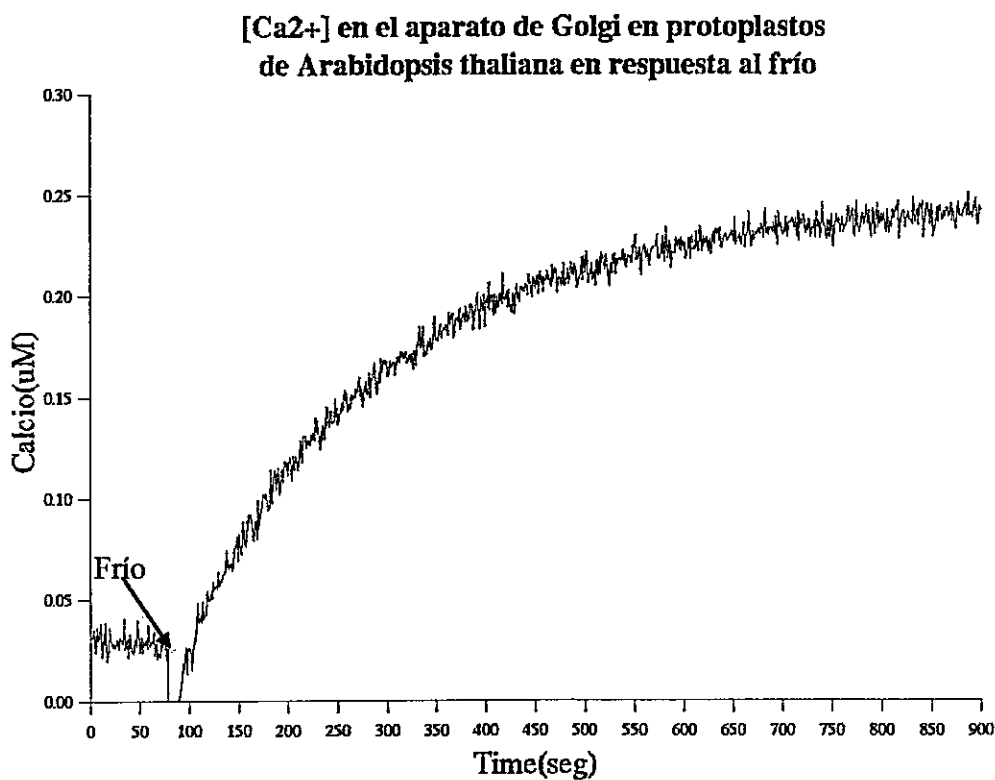


Figura 26. Variación en la concentración de Calcio del Golgi en protoplastos característica de *A. thaliana* frente a un estímulo frío. La gráfica muestra la dinámica de Calcio en el aparato de Golgi de protoplastos al someterlos a 4°C.

Como podemos ver en la Figura 26, la concentración de Calcio en el aparato de Golgi, al contrario de células animales, aumenta y no actúa liberando calcio al citosol.

5 Discusión

En este trabajo se desarrolló y generó una serie de líneas transgénicas de *A. thaliana* con el fin de estudiar el rol de HMA1 en la fisiología vegetal y principalmente en la homeostasis de Calcio. Las tres líneas transgénicas fueron generadas mediante la incorporación de un constructo que posee un RNA interferencia específico para *hma1*. Las líneas parentales fueron:

- “wildtype” ecotipo Columbia.
- CytAeq (expresa la proteína luminiscente Aequorina libre en el citosol)
- GolAeq (expresa la proteína luminiscente Aequorina dirigida al lumen del aparato de Golgi)

HMA1 ha sido clasificada como una ATPasa tipo P, perteneciente a la subfamilia de las ATPasas P1B. Los miembros de esta familia de proteínas son transportadores activos de iones que se caracterizan por la formación de un intermediario fosforilado en el ciclo de transporte, la clasificación en subfamilias se realiza a partir de las secuencias aminoacídicas y del ion que son capaces de transportar. Es así como HMA1 se ha clasificado dentro de los transportadores de metales pesados, subfamilia P1B. Se ha visto que las proteínas perteneciente a esta subfamilia tienen un papel fundamental no solo en la detoxificación de metales pesados (Williams y col., 2000), si no también en la movilización de estos a distintos organelos. Estudios realizados en las secuencia aminoacídicas han descrito una serie de dominios conservados que son característicos y específicos de esta subfamilia, dentro de los cuales se encuentran una serie de secuencia capaces de unir metales pesados como los motivos CXXC (Williams, L., Mills, R.) y las colas de poli histidinas (Mills y col., 2003.). En el sexto segmento transmembrana se encuentra una secuencia involucrada en el transporte del ion, generalmente es una secuencia CPx, sin embargo en HMA1 esta presente un dominio poco característico SPC, el que ha sido encontrado en transportadores de este tipo pero no se conoce de su especificidad (Arguello, 2003).

También es importante destacar el motivo LDEFG en el tallo del quinto segmento transmembrana, este motivo es característico de la subfamilia P2A, la que comprende transportadores de calcio como la SERCA ATPasa, y es además, el motivo descrito como de unión y necesario para la inhibición por el sesquiterpeno thapsigargina.

Algunos estudios han sugerido que HMA1 es una proteína transportadora de Cobre y que esta destinada al cloroplasto (Seigneurin-Berny y col. 2005.), sin embargo en estos estudios no se ha realizado ensayos de transporte que verifiquen lo anterior.

Estudios de complementación heteróloga en levaduras mutantes, carentes de transportadores de Calcio realizados en nuestro laboratorio han demostrado que HMA1 es capaz de transportar Calcio y más aún, se ha visto que este transporte es inhibido por thapsigargina. En experimentos similares pero utilizando levaduras mutantes en YCF1 (un transportador SBC de glutatión conjugado con metales pesados, que permite tolerar altas concentraciones de metales pesados como el Cadmio) se comprobó que HMA1 es capaz de complementarlas y así sobreviven a altas concentraciones de cadmio (I. Moreno y col., 2008). La inhibición por thapsigargina ha sido un campo de estudio muy intenso y se ha llegado a determinar tanto el dominio de unión como el mecanismo de inhibición. En plantas se ha encontrado que existe un transporte de calcio inhibible por thapsigargina en el aparato de Golgi (Ordenes y col., 2002).

5.1 RNA interferencia para hma1

El constructo para provocar el silenciamiento de HMA1, se generó en dos fases. Primero se unió por la técnica de PCR traslapado (Vallejo y col. 1995) el intrón con la secuencia antisentido. Esta técnica de PCR traslapado mostró ser eficiente y rápida, el que fue clonado en el vector pGEM-T. Luego el fragmento IZ (orientción sentido) fue clonado por corte con enzimas de digestión seguido de ligación. Para comprobar que el constructo obtenido era el esperado, procedimos a realizar una serie de

digestiones con enzimas de restricción y paralelamente realizamos amplificaciones por PCR con una serie de partidores. La técnica de PCR dio resultados no concluyentes por lo cual no fueron mostrados, creemos que estos resultados son debido a la complementariedad de los extremos del constructo, lo cual provocaría una serie de estructuras secundarias que alteran el proceso de elongación y unión de los partidores, dando como resultado una serie de bandas indefinibles (resultados no mostrados). Para la digestión se utilizaron las enzimas de restricción *SpeI* y *BglII* en reacciones separadas. En el primer caso (utilizando *SpeI*) se ve que se liberó un fragmento del tamaño adecuado el que corresponde al constructo. Para el caso de la enzima de restricción *BglII* también se liberó el fragmento esperado, el cual incluye parte del vector pER8 y del constructo.

5.2 Silenciamiento de HMA1.

Para evaluar el silenciamiento de HMA1 en las plantas transgénicas se utilizó la técnica de RT-PCR. Esta técnica consta de 3 pasos, extracción de RNA, síntesis de cADN y Amplificación por PCR. Además, al utilizar un sistema inducible por β -estradiol se procedió primero a inducir el silenciamiento de distintas maneras para evaluar la eficiencia. Primero se probó el silenciamiento de plantas crecidas en medio MS por 7 días y luego transplantarlas a medio MS con inductor, también se probó agregando el inductor al medio hidropónico y por último asperjando las plantas con el inductor. De estas tres maneras de inducir solo se obtuvo resultados positivos en las plantas transplantadas a medio MS con inductor y mantenidas en este durante 7 días aproximadamente. Sin embargo, los resultados de silenciamiento fueron variables y no del todo reproducibles, en una de las repeticiones (n=4) no se observó silenciamiento. Esta variabilidad en la reproducibilidad se debe principalmente a complicaciones con la técnica de inducción. La inducción por β -estradiol está influida por varios

factores. Primero, el inductor (β -estradiol) es inestable, lo que hace que la inducción de la expresión llegue a un máximo (a las ~24 h) y luego la inducción disminuye durante una semana (Guo y col. 2003, Zuo y col 2000). Es por esto que Guo y col (2003) incorporaron sitios Cre/lox en el constructo para lograr una expresión constitutiva inducible de moléculas de hpRNA. Otra desventaja que presenta este sistema inducible es el reducido transporte del inductor en las células, es así que la inducción ocurre específicamente en las células que están en contacto con el inductor. Sin embargo estas desventajas del sistema son superadas por propiedades del mecanismo de RNA interferencia, en el cual se ha visto que las moléculas de silenciamiento se esparcen por toda la planta gracias a una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) (Forrest y col., 2004) la que amplifica las moléculas silentes, las que a su vez son capaces de transportarse a larga distancia por el floema (Himber y col., 2003) y de célula a célula por los plasmodesmos, lo que induce y gatilla el silenciamiento en todo el organismo (sistémicamente).

Este sistema se utilizó ya que da cierta libertad y mayor especificidad al efecto producido por el silenciamiento. Los organismos vivos tienen la capacidad de adaptación a cambios externos como internos, lo que nos hace suponer que el organismo tratara de complementar alguna función que no posea mediante cambios globales, lo que podría ocultar el verdadero efecto de un silenciamiento, es por esto que se decidió utilizar un sistema de silenciamiento inducible, para determinar más claramente los efectos que provocan esa falta de función sin tener interferentes de adaptación.

Por último pudimos observar que al germinar plantas en medio MS en presencia del inductor la raíz generaba un fenotipo extraño, que se caracteriza por un mayor número de raíces, y el crecimiento en forma de espiral de estas (datos no mostrados) lo que sugiere que el inductor tiene efecto en plantas al contrario de lo que se había descrito en estudios anteriores, donde se señala que el inductor no tiene

efecto en la fisiología celular (Zuo y col. 2000; Zuo y col. 2001; Guo y col. 2003).

Con todos estos antecedentes hemos determinado que este sistema es un buen sistema de generar plantas con silenciamiento específico inducible siempre que se realicen ciertos controles necesarios como la generación de plantas control que posean algún tipo de gen reportero bajo el promotor inducible, para de esta manera, determinar si la falta de reproducibilidad se debe a un problema en la inducción o en el silenciamiento.

5.3 Expresión de HMA1 en diferentes tejidos de *A. thaliana*

Para evaluar si *hmal* se expresaba de forma ubicua o presentaba algún tipo de expresión tejido específica se procedió a extraer RNA (ver materiales y métodos) de distintos tejidos de *A. thaliana* de 3 semanas, crecidas en medio hidropónico. Los tejidos utilizados fueron flores, hojas, tallos y raíz. Para la síntesis de cDNA se utilizó la misma concentración de RNA para cada tejido. Como se ve en la Figura 23 la expresión es mayor en tejidos verdes (tallo y hoja) y también en flores. Sin embargo la expresión en raíz es muy baja. Esto corrobora lo que se ha descrito por estudios de microarreglos, los que muestran que *hmal* se expresa en los tejidos verdes principalmente.

5.4 Transformación de *Arabidopsis thaliana*.

En el proceso de transformación de *A. thaliana* con el vector de silenciamiento se obtuvo tasas de transformación 1,5% 1,8% y 1,9% para las líneas parentales “*wildtype*”, CytAeq y GolAeq respectivamente. En el proceso de selección hubo ciertas dificultades, esto debido a la utilización de una hygromicina en polvo adquirida en Sigma. Con esta hygromicina no se obtuvo plantas resistentes en ninguna concentración en un rango de 6 a 30 µg/ml. Luego se utilizó una hygromicina adquirida en Calbiochem, la cual se utilizó a una concentración de 20 µg/ml dando una selección eficaz, con claras

diferentes entre plantas resistentes y sensibles. Todas las plantas que germinaron tenían coloración verde (Figura 20), pero las plantas resistentes tenían un tamaño considerablemente mayor. Las plantas seleccionadas fueron posteriormente confirmadas por PCR contra el gen de resistencia, dando positivo en el 100% de las plantas seleccionadas.

5.5 Aequorina en el aparato de Golgi.

Para evaluar que la aequorina estuviese realmente destinada al aparato de Golgi se utilizó la técnica de western blot con un anticuerpo monoclonal para la Aequorina. Primero se realizó fraccionamiento subcelular de *A. thaliana* y se utilizó la fracción enriquecida en aparato de Golgi. Estas vesículas obtenidas fueron permeabilizadas y tratadas con tripsina y como control fueron tratadas con tripsina sin haber sido permeabilizadas como también sin tratamiento alguno. De la Figura 24 vemos que en el caso de ningún tratamiento se logra detectar la proteína quimérica TMD-Aequorina, mientras que en el caso de tratamiento con tripsina pero sin haber sido permeabilizadas se observa que cierto porcentaje de la TMD-Aequorina a sido digerida. Esto se debe a que algún porcentaje de las vesículas no están correctamente selladas, lo que permite el paso de la tripsina hacia el interior. Sin embargo al permeabilizar las vesículas y luego tratarlas con tripsina obtenemos que toda la TMD-Aequorina ha sido digerida lo que nos indica que esta está en el lumen del aparato de Golgi. Llama la atención que en los tratamientos con tripsina exista una banda, suponiendo que la tripsina digiere la proteína. Sin embargo se ha descrito que la Aequorina es resistente a la acción de tripsina cuando esta se encuentra plegada, esto sugiere que la tripsina esta procesando el fallo que ancla la Aequorina con la membrana del aparato de Golgi, el cual si esta disponible a la acción de la tripsina.

5.6 Fluctuaciones en la concentración de Calcio.

Para evaluar los cambios en la concentración de calcio que ocurre en las células de *A. thaliana* frente a un estímulo abiótico, como el frío, se utilizó las líneas de *A. thaliana* que expresan la apoproteína luminiscente Aequorina ya sea en el citosol o destinada al aparato de Golgi. El cambio de concentración en el citosol ha sido bien descrita frente a una variedad de estímulos como el frío (Alvarez y col., 2002; Knight y col., 1996; Knight y col., 1997; Logan y col., 2003; Hetherington y col., 2004; Volotovski y col., 1998; Carpaneto y col., 2006; Van Den Brink y col., 1999; Hetherington y col., 2004; Xiong y col., 2006; Zhu J., 2002), sin embargo nunca se ha descrito que es lo que ocurre en el aparato de Golgi frente al mismo estímulo. Como podemos ver en la Figura 26, la concentración inicial de calcio en el aparato es relativamente bajo, en el rango micromolar, al contrario de mamíferos donde la concentración basal alcanza los 300 micromolar. Sin embargo se puede observar que, tras un estímulo de frío, ocurre un aumento en el calcio libre del aparato de Golgi. Este aumento es considerablemente más lento que en el citosol (Figura 25), y ocurre posteriormente. Como vemos en la Figura 26, el flujo total de calcio es hacia el interior del aparato de Golgi, generando un aumento en la concentración dentro de este. Según lo visto por ordenes y col, (2002), hay presencia de bombas de calcio en el aparato de golgi, cuya actividad es inhibible por Tg. Paralelamente, los resultados de Moreno y col (2008) indican que HMA1 es una bomba de calcio inhibible por Tg. Todo esto nos lleva a sugerir que parte del transporte observado en estos experimentos son debidos a HMA1.

Los organelos como el retículo endoplásmico y la vacuola, funcionan como reservorios de calcio, el cual es liberado al citosol en respuesta a algún estímulo, sin embargo en el aparato de Golgi no observamos eso, por el contrario, se observó un aumento en el calcio libre, el cual podría estar relacionado con la normalización y redistribución del Calcio en la célula ya sea hacia los organelos o su excreción hacia la pared celular. No podemos olvidarnos que el calcio cumple una función muy

importante en la síntesis de la pared celular uniendo las pectinas recién sintetizadas en el aparato de Golgi, por lo cual este aumento que observamos podría deberse también a un aumento en el metabolismo de la pared. Para dilucidar la función del calcio en el aparato de Golgi hacen falta varios experimentos.

En este trabajo solo se implementó la técnica de luminometría en el laboratorio y se caracterizó las variaciones de calcio en protoplastos, tanto en el citosol como en el aparato de Golgi frente a un estímulo abiótico como el frío, y así sentar las bases para el estudio de hma1 en la homeostasis de calcio.

6 Conclusiones

- El RNA interferencia diseñado tiene la capacidad de silenciar *hmal*.
- La línea transgénica “*wildtype*” + RNAi produjo el silenciamiento de *hmal*.
- *hmal* tiene una expresión preferencial en los tejidos verdes y aéreos.
- La Aequorina destinada al aparato de Golgi está hacia el lumen de este.
- La variación de la concentración de calcio en el citosol de protoplastos posee una forma y amplitud similar al previamente observado en plántulas.
- La variación de la concentración de Calcio en el aparato de Golgi de protoplastos poseen una forma y amplitud similar al observado previamente en plántulas.

7 Proyecciones y trabajo futuro

- Corroborar el silenciamiento de *hma1* en las líneas que expresan la proteína Aequorina en el citosol y en el aparato de Golgi.
- Caracterizar las variaciones de la concentración calcio tanto en el citosol como en el aparato de Golgi para las plantas silenciadas.
- Caracterizar el efecto de la thapsigargina en las variaciones de la concentración de calcio en el aparato de Golgi, y ver que ocurre en plantas silenciadas y "*wildtype*".
- Crecer las plantas silenciadas en medio con distinta concentración de metales y compararlas con plantas no silenciadas en la misma condición.
- Hacer ensayos de transporte de calcio en vesículas del aparato de Golgi en plantas silenciadas y no silenciadas. Evaluar el efecto de la thapsigargina en estos ensayos.

8 Bibliografía

Abdel-Ghany S., Muller-Moule P., Niyogi K., Pilon M., y Shikanai T. (2005) "Two P-Type ATPases are required to copper delivery in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts", *Plant Cell*, 17(4), 1233-1251.

Agrawal, N., Dasaradhi, V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., y Mukherjee S. (2003) "RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657-685.

Alvarez, J., y Montero, M. (2002) "Measuring $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum with aequorin", *Cell Calcium*, 32(5-6), 251-260.

Arguello J. (2003) "Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases." *Journal of Membrane Biology*, 195(2), 93-108.

Axelsen K., y Palmgren M. (2001) "Inventory of the superfamily of P-Type ion pumps in *Arabidopsis*", *Plant Physiology*, 126, 696-706.

Brini, M., Pinton, P., Pozzan, T., y Rizzuto, R. (1999) "Targeted recombinant aequorins: Tools for monitoring $[Ca^{2+}]$ in the various compartments of a living cell", *Microscopy research and technique*, 46, 380-389.

Carpaneto A., Ivashikina N., Levchenko V., Krol E., Jeworutzki E., Zhu J., y Hedrich R. (2006) "Cold transiently activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells", *Plant Physiology*,

143, 487-494.

Chen H, Nelson RS, Sherwood JL. (1994) "Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection". *Biotechniques* Apr;16(4):664-8, 670.

Chiesa, A., Rapizzi, E., Tosello, V., Pinton, P., y Virgilio, M.(2001) "Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling", *Biochemical Journal*, 355, 1-12.

Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *Plant Journal* 16(6), 735-43.

Cobbett C., Hussain D., y Haydon M.(2003) "Structural and functional relationships between type P1B heavy metal-transporting P-type ATPases in *Arabidopsis*". *New Phytologist* 159, 315-321.

Dawar Hussain, Michael J. Haydon, Yuwen Wang, Edwin Wong, Sarah M. Sherson, Young J., Camakaris J., Harper J., y Cobbett C.(2004) "P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with roles in Essential Zinc Homeostasis in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 16, 1327-1339.

Fire A., Su S., Montgomey M., Kostas S., Driver S., y Mello C.(1999) "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 391, 806-811.

Forrest E., Cogoni C., y Macino G.(2004) "The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*", *Nucleic Acids Research*,

32(7), 2123-2128.

Geisler M., Axelsen K., Harper J., y Palmgren M.(2000) "Molecular aspects of higher plant P-Type Ca^{2+} -ATPases", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 52-78.

Gravot A., Lieutaud A., Verret F., Auroy P., Vavasseur A., y Richaud P.(2004) "AtHMA3, a plant PIB-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast", *FEBS Letters*, 561, 22-28.

Guo, H., Fei, J., y Chua, N.(2003) "A chemical inducible RNAi system in plants", *Plant Journal*, 34(3), 383-392.

Hetherington, A., y Brownlee, C.(2004) "The generation of Ca^{2+} signals in plants", *Annu. Rev. Plant Biol.*, 44, 401-427.

Ishige, F., Takaichi M., Foster R., Chua N.H., y Oeda K. (1999). "A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocots plants", *Plant Journal*, 18, 443-448.

Knight, H., Trewavas, A., y Knight, M.(1996) "Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and change in calcium signature after acclimation", *Plant Cell*, 8, 489-503.

Knight, M., Trewavas, A., y Knight, M.(1997) "Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity", *Plant Journal*, 12(5), 1067-1078.

Kusaba M. (2002) "RNA interference in crop plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 139-14

Liang F., y Sze H.(1998) "A high-affinity Ca^{2+} pump, ECA1, from the endoplasmic reticulum is inhibited by Cyclopiazonic Acid but not by Thapsigargin", *Plant Physiology*, 118, 817-825.

Logan, D., y Knight, M.(2003) "Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants", *Plant Physiology*, 133, 21-24.

Mansoor, S, Amin, I, Hussain, M, Zafar, Y, Briddon, RW (2006). "Engineering novel traits in plants through RNA interference." *Trends Plant Sci.*, 11(11), 559-65.

McAnish M., y Hetherington A.(1998) "Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems", *Trends in Plants Science*, 3, 32-36.

Mills R., Krijger G., Baccarini P., Hall J.L., y Williams E.(2003) "Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass", *Plant Journal*, 35, 164-176.

Mithofer A., y Mazars C.(2002) "Aequorin-based measurements of intracellular Ca^{2+} -signatures in plant cell", *Biological Procedures.*, 4(1), 105-118.

Moreno I., Norambuena L., Maturana D., Toro M., Vergara C., Orellana A., Zurita-Silva A. y Ordenes V. (2008) "AtHMA1 Is A Thapsigargin-sensitive Ca^{2+} / Heavy Metal Pump", *J. Biol. Chem.*, 283(15),

9633-9641.

Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture." *Physiologia Plantarum* 15, 473 - 497.

Ordenes V., Reyes F., Wolff D., y Orellana A. (2002) "A thapsigargin-sensitive Ca²⁺ pump is present in the pea golgi apparatus membrane", *Plant Physiology*, 129, 1820-1828.

Palmgren, M., y Axelsen, K. (1998) "Evolution of P-type ATPases", *Biochim. Biophys. Acta*, 1365, 37-45.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., y Harper J. (2002) "Calcium at the crossroads of signaling", *Plant Cell*, Supplement 2002, 401-417.

Seigneurin-Berny D., Gravot A., Auroy P., Mazard C., Kraut A., Finazzi G., Grunwald D., Rappaport F., Vavasseur A., Joyard J., Richaud P., y Rolland N. (2005) "HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions", *J. Biol. Chem.*, 281(5), 2882-2892.

Shikanaru T., Muller-Molle P., Munekage Y., Niyogi K., y Pilon M. (2003) "PAA1, a P-Type ATPase of

Arabidopsis, functions in Copper transport in Chloroplasts", *Plant Cell*, 15, 1333-1346.

Stefan, P., y Ball, W.(2004) "Molecular determinants of thapsigargin binding by SERCA Ca²⁺-ATPase: A computational docking study", *PROTEINS*, 56, 595-606.

Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J., y Herman, B.(1999) "Measurement of intracellular calcium", *Physiological reviews*, 79(4), 1089-1125.

Trewavas A.(2004) "Aspects of plant intelligence: an answer to fern", *Annals of Botany*, 93, 353-357.

Urbina D., Meisel L., y Silva H.(2006) "Ca²⁺ pump inhibitor, Thapsigargin, inhibits root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*", *Biological Research*, 39(2), 289-296.

Van Den Brink G., Bloemers M., Van Den Blink B., Tertoolen L., Van Deventer S., y Peppelenbosch M.(1999) "Study of calcium signaling in non-excitabile cells", *Microscopy Research and Technique*, 46, 418-433.

Volotovski, I., Sokolovsky, S., Molchan, O., y Knight, M.(1998) "Second messenger mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts", *Plant Physiology*, 117, 1023-130.

White P., y Broadley M.(2003) "Calcium in plants", *Annals of Botany*, 92, 487-511.

Williams L., Pittman J., y Hall J.(2000) "Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants",

Biochimica et Biophysica Acta, 1465, 104-126.

Williams, L., y Mills, R.(2005) "P1B-ATPases- an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants", Trends in Plant Science, 10(10), 491-502.

Xiong T., Bourque S., Lecourieux D., Amelot N., Grat S., Brière C., Mazars, Pugin A., y Ranjeva R. (2006) "Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane", Biochimica et Biophysica Acta, 1763, 1209-1215.

Xu, C., Ma, H., Inesi, G., Al-Shawi, M., y Toyoshima, C.(2004) "Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca²⁺ ATPase SERCA", J. Biol. Chem., 279(17), 17973-17979.

Young, H., Xu, C. Zhang, P., y Stokes, D.(2001) "Locating the thapsigargin-binding site on Ca²⁺-ATPase by Cryoelectron microscopy", Journal of Molecular Biology, 308, 231-240.

Zhu J.(2002) "Salt and drought stress signal transduction in plants", Annual Reviews in Plant Biology, 53, 247-273.

Zuo, J., Niu, Q. y Chua, N.(2000) "An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants", Plant Journal, 24(2), 265-273.

Zuo, J., Niu, Q., Moller, S. G., y Chua, N.(2001) "Chemical -regulated, site-specific DNA excision in

transgenic plants", *Nature Biotechnology*, 19, 157-161.