

UCH-FC  
Biotecnología  
M 285  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS



**“Efecto de Sortin2 en procesos endocíticos:  
Alteraciones y productos génicos asociados”**

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

Autor de Seminario de Título: **Sr. Nicolás A. Manríquez N.**

Directora de Seminario de Título: **Dra. Lorena Norambuena M.**

Noviembre 2015  
Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS

## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Nicolás A. Manríquez Naveas.

### **“Efecto de Sortin2 en procesos endocíticos: Alteraciones y productos génicos asociados”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Lorena Norambuena  
**Directora Seminario de Título**



Dr. Michael Handford  
**Co-Director**

#### **Comisión de Evaluación**

**Presidenta de la Comisión**

*Cecilia Stange*  
*Elis Utreros*

**Evaluador**

Santiago de Chile, Noviembre del 2015

## DEDICATORIA



### **A mis padres y hermanos**

*Por impulsarme y por apoyarme en todo momento, por el esfuerzo y sacrificio de los primeros, para que nosotros pudiéramos tener una vida feliz. Al cariño y la bondad de los segundos, que me ha permitido ser la persona que soy hoy. Los amo, y espero en el tiempo poder retribuirles una mínima parte de lo que han hecho por mí.*

### **A mi esposa y mis hijos**

*Por acompañarme desde antes de iniciar este camino, por no abandonar, por ser un ejemplo del esfuerzo y la dedicación. Amiga y confidente, gracias por siempre estar ahí, te amo. A mis hijos, Vicente y ..., sean felices, simples, humildes, pero por sobre todo: felices. Rían, salten, jueguen, canten, bailen, lo demás viene con el tiempo y el tiempo es de ustedes.*

### **A mis amigos**

*A los de siempre, a los que no veo nunca y a los que veo todos los días, gracias por las alegrías. No los voy a nombrar, pero tú sabes que eres uno de ellos.*

## ÍNDICE

<b>Listado de figuras</b>	v
<b>Listado de tablas</b>	vi
<b>Abreviaturas</b>	vii
<b>Resumen</b>	viii
<b>Abstract</b>	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. El sistema de endomembranas	1
1.2. Endocitosis, exocitosis y tráfico vesicular intracelular	2
1.3. Formación de vesículas con cubierta de clatrina	5
1.4. Estudio del tráfico vesicular: genética clásica y biomoduladores	7
1.5. Sorting Inhibitors (Sortins): Biomoduladores del tráfico vesicular	9
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. Crecimiento de levaduras	12
3.2. Tratamiento de Sortin2 y sus análogos estructurales en levaduras	12
3.3. Tratamiento FM4-64 en levaduras	13
3.4. Evaluación de la endocitosis en levaduras mediante microscopía confocal	13
3.5. Esterilización y crecimiento de <i>A. thaliana</i>	13
3.6. Extracción de DNA de plantas de <i>A. thaliana</i>	14
3.7. Genotipificación por PCR y expresión de genes ortólogos en <i>A. thaliana</i>	15

3.8.	Extracción de RNA	16
3.9.	Semi-cuantificación de mRNA en <i>A. thaliana</i>	16
3.10.	Tratamiento control y con Sortin2 en <i>A. thaliana</i>	17
3.11.	Tratamiento con FM4-64 y microscopía confocal en <i>A. thaliana</i>	17
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
4.1.	Caracterización del efecto de Sortin2 en una cepa silvestre y en mutantes haploides de <i>S. cerevisiae</i> , que presentan resistencia a Sortin2	18
4.1.1.	Efecto de Sortin2 en la endocitosis del marcador fluorescente FM4-64 en una cepa silvestre de <i>S. cerevisiae</i>	19
4.1.2.	Internalización del marcador FM4-64 en mutantes haploides de <i>S. cerevisiae</i>	21
4.1.3.	Tratamientos con análogos estructurales de Sortin2 y efecto en la endocitosis de las distintas cepas resistentes a Sortin2	24
4.2.	Búsqueda de genes ortólogos a <i>clc1</i> y <i>sla1</i> de <i>S. cerevisiae</i> en <i>A. thaliana</i> y genotipificación de mutantes insercionales	31
4.2.1.	Búsqueda de genes ortólogos a <i>clc1</i> y <i>sla1</i> de <i>S. cerevisiae</i> en <i>A. thaliana</i>	31
4.2.2.	Selección de líneas mutantes de <i>A. thaliana</i> en los genes At2g40060 y At3g51890 y diseño de la estrategia molecular para su genotipificación	35
4.2.3.	Genotipificación de las mutantes con inserciones de T-DNA, Salk_059605 y Salk_131789, mediante técnicas de PCR	38
4.3.	Caracterización de los procesos endocíticos en mutantes insercionales de <i>A. thaliana</i> de los genes ortólogos a <i>clc1</i> , At2g40060 y At3g51890, mediante la internalización de un trazador fluorescente	41
4.3.1.	Análisis bioinformático de los patrones de expresión de genes parálogos a <i>clc1</i> y extracción de RNA de plantas de <i>A. thaliana</i>	42
4.3.2.	Diseño de partidores y estandarización de protocolo de PCR semi-cuantitativo	46
4.3.3.	Semi-cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de los ortólogos a <i>clc1</i> en líneas mutantes insercionales homocigotas en los genes At2g40060 y At3g51890	49
4.3.4.	Evaluación de la cinética de endocitosis en líneas mutantes insercionales homocigotas en los genes At2g40060 y At3g51890 de <i>A. thaliana</i>	51
<b>5.</b>	<b>DISCUSIONES</b>	
5.1.	Caracterización de los procesos endocíticos en cepas de <i>S. cerevisiae</i> , mediante la internalización de un marcador fluorescente	57
5.2.	Búsqueda de genes ortólogos a <i>clc1</i> y <i>sla1</i> de <i>S. cerevisiae</i> en <i>A. thaliana</i> y genotipificación de mutantes insercionales	58

5.3.	Caracterizar los procesos endocíticos en mutantes insercionales de <i>A. thaliana</i> para los genes ortólogos a <i>clc1</i> y <i>sla1</i> , mediante la internalización de un marcador fluorescente	60
6.	<b>CONCLUSIONES</b>	63
7.	<b>REFERENCIAS</b>	65

## Listado de Figuras

Figura 1. Rutas de tráfico vesicular	4
Figura 2. Clatrina y otras proteínas que participan en la endocitosis	7
Figura 3. Secreción de CPY en cepas de <i>S. cerevisiae</i> bajo tratamiento con Sortin2	10
Figura 4. Cinética de internalización de FM4-64 en <i>S. cerevisiae</i> silvestre	19
Figura 5. Efecto de Sortin2 en la endocitosis de FM4-64	20
Figura 6. Sortin2 no afecta la endocitosis del marcador en cepas mutantes de <i>S. cerevisiae</i> .	23
Figura 7. Efecto de los análogos estructurales de Sortin2 en la endocitosis del trazador FM4-64	26
Figura 8. Efecto de los análogos estructurales de Sortin2 en la endocitosis del trazador FM4-64 en la cepa $\Delta clc1$ de <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 9. Efecto de los análogos estructurales de Sortin2 en la endocitosis del trazador FM4-64 en la cepa $\Delta sla1$ de <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura 10. Búsqueda de homólogos al gen de <i>A. thaliana</i> At2g40060 mediante BLAST-P en bases de datos	33
Figura 11. Alineamiento de secuencias aminoacídicas codificadas por los genes At2g40060, At3g51890 y At2g40060	34
Figura 12. Líneas mutantes insercionales en homocigosis disponibles en banco de semillas SALK	36
Figura 13. Diseño de partidores específicos para análisis de homocigosis insercional	38
Figura 14. Análisis de homocigosis en líneas mutantes insercionales de <i>A. thaliana</i>	41
Figura 15. Expresión absoluta de genes At2g40060, At3g51890 y At2g20760, según eFP browser	44
Figura 16. Integridad de RNA y especificidad de partidores	46
Figura 17. Niveles de expresión de genes ortólogos a <i>clc</i> en <i>A. thaliana</i>	50
Figura 18. Endocitosis de trazador FM4-64 en <i>A. thaliana</i>	52
Figura 19. Endocitosis de trazador FM4-64 en línea mutante Salk_059605	54
Figura 20. Endocitosis de trazador FM4-64 en línea mutante Salk_131789	55

## Listado de Tablas

Tabla 1. Ontología Génica (GO) de genes cuya delección provoca resistencia a Sortin2 en <i>S. cerevisiae</i>	22
Tabla 2. Resumen de plantas de <i>A. thaliana</i> analizadas durante la genotipificación	40
Tabla 3. Partidores utilizados para análisis	48

## Abreviaturas utilizadas

°C	: Grados Celsius
BLAST-P	: Herramienta de alineamiento local básico (del inglés Basic local alignment tool)
CHC	: Cadena pesada de clatrina (del inglés clathrin heavy chain)
CLC	: Cadena liviana de clatrina (del inglés clathrin light chain)
CPY	: Carboxypeptidasa Y
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DNA	: Ácido desoxiribonucleico (del inglés deoxyribonucleic acid)
GO	: Ontología Génica (del inglés Gene Ontology)
HM	: Homocigotas
HT	: Heterocigotas
LB	: Borde izquierdo del T-DNA (del inglés Left Border)
mg	: Miligramos
mL	: Mililitros
mM	: Milimolar
MS	: Medio de cultivo Murashige y Skoog
NCBI	: Centro Nacional de información biotecnológica (del inglés National Center for Biotechnology Information)
ND	: No determinado
Nm	: Nanómetros
p/v	: Peso/volumen
Pb	: Pares de bases
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase chain reaction)
PVC	: Compartimento pre-vacuolar (del inglés pre-vacuolar compartment)
RE	: Retículo endoplásmico
RNA	: Ácido ribonucleico (del inglés Ribonucleic acid)
rpm	: Revoluciones por minuto
RT-PCR	: PCR con transcriptasa reversa
SE	: Sistema de endomembranas
SI	: Sin inserción
Sortins	: Inhibidores de la clasificación (del inglés Sorting inhibitors)
TAIR	: Fuente de información de Arabidopsis (del inglés The Arabidopsis Information Resource)
T-DNA	: ADN de transferencia (del inglés Transfer DNA)
TGN	: Red Trans-Golgi (del inglés Trans-Golgi Network)
µL	: Microlitros
µM	: Micromolar
v/v	: Volumen/volumen
YPD	: Medio de cultivo que contiene extracto de levadura, peptona y dextrosa (del inglés Yeast extract-peptone-dextrose)

## Resumen

La genómica química permite de manera transitoria, reversible y/o gradual estudiar la función de proteínas o familias de éstas, alterando distintos procesos biológicos de manera alternativa a otras metodologías, sorteando de esta manera posibles complicaciones que plantea la genética clásica, como por ejemplo la letalidad. En este contexto, se han descrito moléculas que alteran el tráfico vesicular en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*. Este conjunto de moléculas denominadas Sortin, del inglés *Sorting Inhibitors*, tiene como característica generar fenotipos que se asemejan a los observados en mutantes del tipo vps (*vacuolar sorting proteins*) las cuales presentan alteraciones en la destinación de proteínas vacuolares. Dentro de este grupo de moléculas la Dra Lorena Norambuena, y el presente seminario de título, ha enfocado su estudio en los efectos fisiológicos y moleculares que presenta Sortin2.

En análisis anteriores de la Dra. Lorena Norambuena se determinó; mediante una búsqueda amplia en el genoma, en una librería indexada de mutantes haploides de *S. cerevisiae*, una serie de líneas resistentes a Sortin2, entre las cuales destacaban mutantes para los genes de cadena liviana de clatrina, *clc1*, y para una proteína accesoria del proceso endocítico de vesículas de clatrina, *sla1* [datos no publicados], las cuales también participan en la ruta de destinación sub-celular de la proteína CPY.

Frente a estas observaciones, en el presente seminario de título se caracterizó el proceso endocítico en cada una de las líneas mutantes de *S. cerevisiae* que presente resistencia total o parcial a Sortin2, mediante el seguimiento de la internalización del marcador

fluorescente FM4-64, que se une a la membrana plasmática y luego es endocitado y destinado a la vacuola a través de vesículas de clatrina. Además se buscaron genes ortólogos a *clc1* y *sla1* en *A. thaliana* y mutantes insercionales en cada uno de los genes ortólogos para observar los procesos endocíticos mediante el mismo marcador fluorescente en aquellas mutantes insercionales.

Los resultados muestran que el biomodulador Sortin2 provoca una alteración en la endocitosis del marcador FM4-64, tanto en *S. cerevisiae* como en *A. thaliana*. A su vez, en cepas de levaduras que tienen deleciones en genes involucrados en el tráfico vesicular, no se observa el efecto del biomodulador Sortin2. En relación a lo anterior, se observa que el fenotipo mutante para *clc* en *S. cerevisiae* presenta una cinética de endocitosis similar al efecto que gatilla el biomodulador, lo que también se observó en líneas mutantes insercionales de *A. thaliana* para los genes ortólogos a *clc*, por lo es posible postular a la cadena liviana de clatrina como uno de los posibles blancos moleculares del biomodulador Sortin 2.

### *Abstract*

*The chemical genomics allows, in a gradual or reversible way, study a protein or a family proteins function, altering distinct biological process alternatively to other methodologies, avoiding possible complications that has the classical genetics, like lethal mutations. In this context, molecules that affects vesicular traffic in Saccharomyces cerevisiae an Arabidopsis thaliana has been described. This group of molecules has been denominated Sortins, from Sorting Inhibitors, and the phenotypes observed is like vps (vacuolar sorting proteins) mutants, which presents a vacuolar protein destination defects. In this group of molecules, PhD. Lorena Norambuena and the present work, focalized the study on Sortin2 and his molecular or physiological effects.*

*PhD Lorena Norambuena in a previous study determines, through a wide-genome search in to an index library of haploid S. cerevisiae mutants, a series of Sortin2 yeast resistant, distinguish a clathrin light chain (clc1) mutant and a sla1 mutants, which has altered the accessory protein to vesicular traffic gene [unpublished data], both are directly involved in the sorting pathway for the vacuolar protein carboxypeptidase-y (CPY).*

*Given these observations I pretend characterize the endocytic process in cells lines that present totally or partial resistance to Sortin2 effects, for this it will be evaluated the internalization of the fluorescent marker FM4-64, which binds to the cell membrane and then was internalized and destined to the vacuolar membrane, through a clathrin-*

*coated vesicles. Besides, orthologous genes will be searched into A. thaliana to characterize the effects of Sortin2 in plant lines that presents a homozygotic insertion in these genes.*

*The results show that Sortin2 altered the S. cerevisiae and A. thaliana endocytosis of FM4-64 marker. Yeast with vesicular traffic-related genes deleted does not altered phenotype in Sortin2 treatment. Related to this, it is observed that clc-deleted vesicular traffic presents the same behavior than a Sortin2 treatment, also observed in the orthologous to clc, A. thaliana mutant-line. Following this, is possible suggest to clathrin light chain as a molecular target of Sortin2 compound.*

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El sistema de endomembranas

La célula posee una estructura en apariencia simple, no obstante en ella suceden procesos sumamente complejos que requieren no sólo de una determinada sincronización espacio-temporal, sino también del correcto funcionamiento de todos sus componentes. Por ello, la estructura subcelular y la correcta destinación de los múltiples productos proteicos que la conforman y que participan de éstos procesos resulta fundamental, tanto como para permitir el trabajo de éstos mecanismos, como también para la viabilidad celular. Así, distintas macromoléculas son destinadas a los diversos compartimentos subcelulares para ejercer su función o ser degradadas, otras son exportadas hacia el medio extracelular y otras internalizadas desde el mismo. Para que este sistema de transporte sea efectivo existe una compleja red de estructuras a través de las cuales los cargos son transportados y destinados hacia su objetivo. En ella participan microfilamentos, proteínas motoras, microtúbulos, vesículas donde se transportan los cargos y una serie de compartimentos membranosos que resultan ser destinos finales o intermediarios en este sistema de tráfico intracelular. El conjunto de éstos compartimentos conforman el sistema de endomembranas (SE) donde, en algunos de ellos, ocurren los procesos de síntesis y modificación post-traduccional de proteínas, como en el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi y la vacuola/lisosoma. Integran además el SE, organelos implicados en el tráfico y distribución de proteínas como la red Trans-Golgi (TGN, del inglés trans-golgi network), estructuras post-golgi como endosomas y el complejo prevacuolar (PVC, del inglés pre-vacuolar compartment). Junto a lo anterior se incluye también la membrana plasmática, en la cual se fusionan y originan las vesículas que transportan componentes (cargos) hacia el

extracelular, el intracelular o macromoléculas que tienen como destino final la misma membrana lipoproteica. (Nebenführ A., 2002; Foresti O. & Denecke J., 2008; Alberts B. y col., 2008).

## **1.2. Endocitosis, exocitosis y tráfico vesicular intracelular**

La membrana plasmática permite, entre otras cosas, darle estabilidad mecánica a la célula y permitir, selectivamente, el paso de moléculas desde y hacia el medio extracelular, ya sean éstas nutrientes o aquellas que actúan como mecanismos de señalización o de defensa frente a otros organismos. En este sentido, el proceso de internalización de elementos desde el extracelular o endocitosis, compromete una serie de proteínas y macroestructuras que permiten, en primera instancia, el reconocimiento de los cargos y con ello la formación de una región claramente definida que, mediante un curvamiento progresivo irá dando origen a la vesícula de transporte, la cual luego se escinde de la membrana plasmática y a través del citoesqueleto es transportada dentro del intracelular donde luego se desensambla para liberar su contenido (Bonifacio J., 2003; Fotin A., 2004; Hinrichsen L., 2006).

Asimismo, en la exocitosis o liberación de cargos hacia el extracelular, la vesícula proveniente desde alguno de los componentes del SE, es destinada hacia la membrana citoplasmática para fusionarse con ésta y liberar su contenido hacia el exterior. Este mecanismo permite, además del reciclaje de los componentes de la misma membrana y de la ya señalada liberación de cargas, modificar la composición de la membrana, según sea el caso, mediante la adición de lípidos de distinta naturaleza; lo que modifica sus propiedades fisicoquímicas y con ello el comportamiento de la membrana (Damer C., 2000; Nebenführ

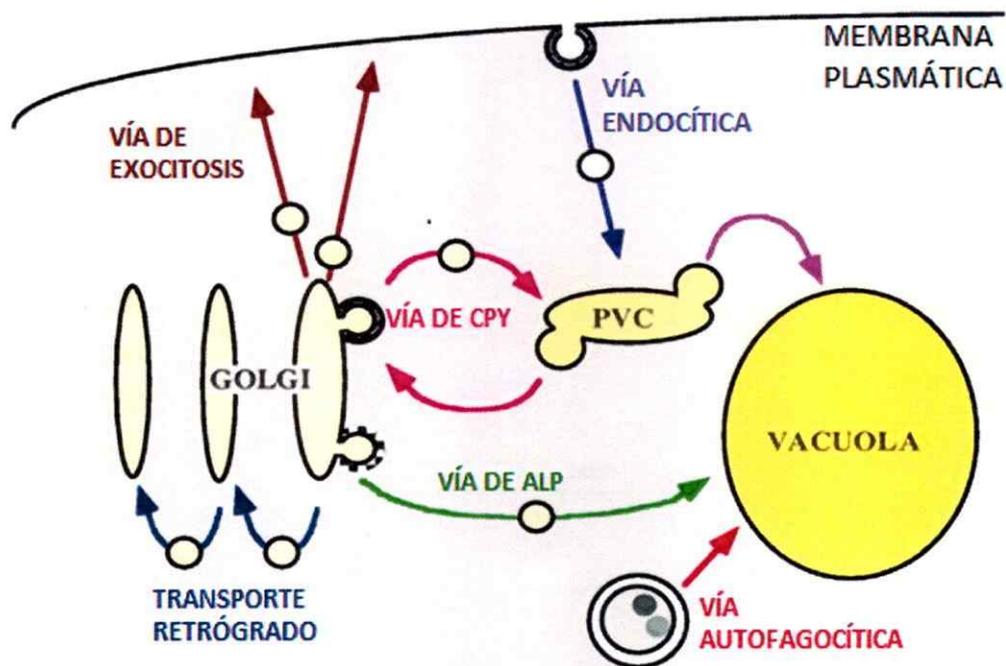
A., 2002). Además de estos mecanismos de transporte y comunicación entre la célula y lo que esté fuera de ella (medio u otros organismos), existe un dinámico e imprescindible sistema de tráfico vesicular a nivel intracelular que permite, no sólo el tránsito de macromoléculas u otros cargos de un compartimento a otro, sino que además, el correcto funcionamiento a nivel subcelular y en consecuencia la viabilidad de celular.

En este contexto, la destinación subcelular se encuentra asociada principalmente, a la existencia de distintas familias de proteínas presentes tanto en la vesícula como en el compartimento u organelo de destino. Esto permitiría el reconocimiento de éstas y con ello la correcta destinación de las vesículas y/o de sus respectivos cargos (Moreau P. y col. 2007; Alberts B. y col., 2008).

Debido a lo específico de estos mecanismos de destinación, se han establecido distintas rutas de tráfico vesicular (Figura 1), en las cuales se observa un alto grado de conservación entre los diferentes modelos de estudio de eucariontes (Galleta B. 2009). Si bien las rutas se encuentran diferenciadas según el compartimento de destino, éstas no son independientes, pues presentan nodos en los que se intersectan distintas rutas, como por ejemplo, las endocíticas y las secretorias. Las rutas de tráfico vesicular poseen también un flujo retrógrado hacia el compartimento u organelo de origen, lo que permite la reincorporación de elementos u otros componentes de éste (Foresti O. & Denecke J., 2008).

Una de las rutas secretorias, es la que siguen algunas proteínas con destinación vacuolar, como la carboxipeptidasa Y (CPY), la cual es sintetizada en el RE y destinada a la vacuola, a través de una ruta que pasa por la TGN y el PVC. Ésta ruta ha sido caracterizada y utilizada como modelo de estudio del tráfico vesicular. También existen rutas con destino

vacuolar que van directamente desde la TGN a la vacuola sin pasar por el PVC, como la ruta de la Fosfatasa alcalina (ALP)



**Figura 1. Rutas de tráfico vesicular.** Esquematación de las rutas de tráfico vesicular que siguen algunas proteínas como CPY o ALP a nivel intracelular, se observan también las rutas secretorias y endocíticas. Las flechas indican la dirección de las vesículas en l ruta y los compartimentos subcelulares a los que se dirigen (Conibear et al, BBA 1998).

Una de las características de la ruta de tráfico vesicular que sigue la proteína CPY es que se realiza por medio de vesículas con cubierta de clatrina, una proteína heterodimérica cuya asociación da origen a una estructura en forma de malla que se asocia a la membrana lipídica que conforma la vesícula en la cual es transportado un cargo en asociación a un receptor específico. Estas vesículas con cubierta de clatrina forman parte también de los mecanismos de endocitosis presentes en los organismos eucariontes por los cuales distintos cargos son internalizados desde el medio exterior hacia el intracelular (Conibear E., 1998; Newpher T., 2006).

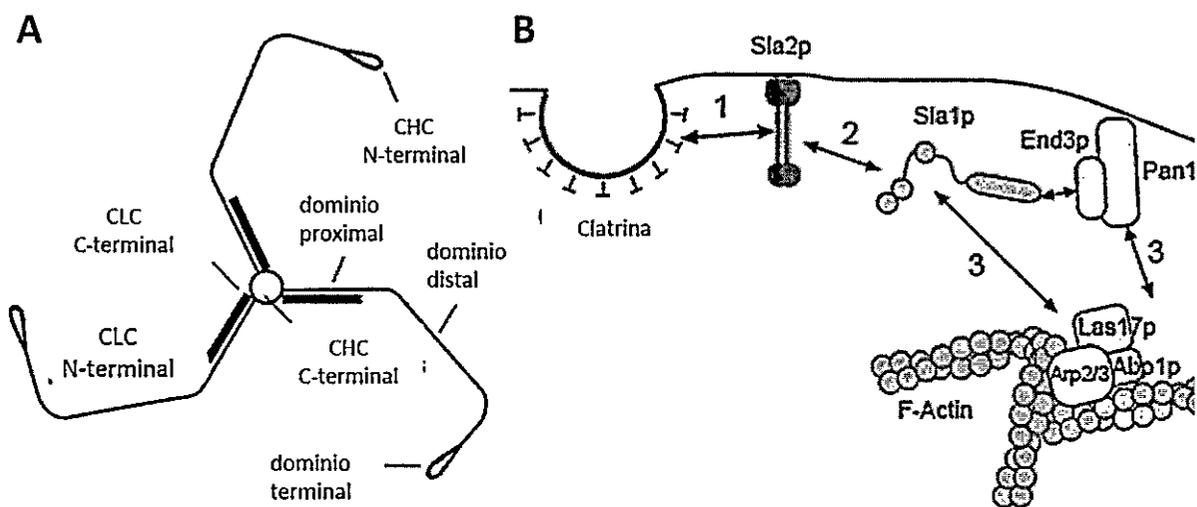
### 1.3. Formación de vesículas con cubierta de clatrina

La formación de una vesícula en general, requiere de la asociación de una serie de proteínas accesorias y complejos proteicos que participan en el reconocimiento de cargos, la destinación y el desensamblaje de la misma. Las vesículas de clatrina en particular, se forman, además de éste conjunto de factores, producto de la asociación de una serie de monómeros de clatrina, denominados *triskelion*. La clatrina corresponde, como se indicó, a una proteína heterodimérica en la cual tres unidades de cadena pesada de clatrina (CHC, del inglés clathrin heavy chain) se unen con tres unidades de cadena liviana de clatrina (CLC del inglés clathrin light chain). Estos monómeros se asocian entre sí para ir dando forma a una cubierta asociada a la membrana que se asemeja a una malla, la cual entrega sostén mecánico además de participar en la formación misma de la vesícula mediante interacción con otras proteínas y el citoesqueleto.

La formación de la vesícula comienza con el reconocimiento del cargo, por medio de los receptores de membrana, los cuales se encuentran asociados tanto a clatrina como a otras proteínas accesorias. Esto induce la formación de una zona enriquecida en clatrina la cual, al ir asociándose, facilitará la invaginación de la membrana formando un pequeño pocillo en cual se encuentra, en una de las caras el cargo asociado al receptor y en la otra una serie de monómeros de clatrina en interacción con la membrana. A esta estructura de pocillo se asocian diversas proteínas y complejos proteicos accesorios, los cuales directa o indirectamente interactúan con componentes del citoesqueleto. Ésta interacción, junto a la asociación de más monómeros de clatrina a la estructura adherida a la membrana ejerce una acción mecánica que favorece la formación de la vesícula, así como también la escisión de la membrana de origen, aunque también existen proteínas como las dinaminas que se

asocian a la vesícula en el “cuello” que se produce entre ésta y la membrana para así, mediante estrangulamiento, permitir la escisión de la vesícula. Otras proteínas importantes durante el proceso de formación de vesículas con cubierta de clatrina son SLA1 y SLA2, las cuales forman un puente interactuando entre componentes del citoesqueleto y la cubierta de clatrina, permitiendo que se ejerza mediante una acción mecánica, debido a la polimerización de los microfilamentos de actina, la invaginación de membrana y con ello la formación de la vesícula (Henry K., 2002; Warren D., 2002; Gourlay C., 2003; Konopka C., 2008) (Figura 2).

El tráfico vesicular mediante vesículas con cubierta de clatrina se encuentra altamente conservado en los organismos eucariotas y es uno de los principales mecanismos de internalización de micro y macronutrientes hacia el intracelular, así como también parte importante en la señalización inter e intracelular y de la destinación de proteínas a distintos compartimentos intracelulares.



**Figura 2. Clatrina y otras proteínas que participan en la endocitosis.** En A se observa una representación del *triskelion* de Clatrina, conformado por 3 unidades de cadena liviana (clc) y tres unidades de cadena pesada de clatrina (chc), modificado de *Warren et al, Journal of Cell Science 2002*. En B se esquematiza la interacción entre clatrina y otras proteínas accesorias que participan en la formación de las vesículas de clatrina, modificado de *Campbell et al, Journal of Cell Science 2002*

#### 1.4. Estudio del tráfico vesicular: genética clásica y biomoduladores

Como se señaló anteriormente, el tráfico vesicular requiere de la participación de una serie de proteínas y complejos los cuales interactúan, ya sea en la etapa de formación de la vesícula, en el transporte o en la destinación de la misma. Además, las modificaciones postraduccionales que sufren algunos de los cargos, también tienen injerencia en la correcta destinación del mismo, por lo que la cantidad de factores involucrados en estos procesos aumenta. En este contexto, estudiar, analizar y comprender el funcionamiento de estos mecanismos subcelulares no ha sido fácil; además, si sumamos a lo anterior que éste proceso es fundamental para la sobrevivencia celular, la complejidad se hace aún mayor principalmente por los métodos de estudio utilizados hasta hace algunos años.

La genética clásica, vista desde un punto de vista cuantitativo, busca observar cambios en el fenotipo de los individuos mediante la alteración o delección de un gen. En este contexto, el estudio del sistema de endomebranas y del tráfico vesicular en particular resulta altamente complejo debido a que, por la naturaleza del mismo, alteraciones en la normalidad del funcionamiento, puede conducir a la inviabilidad celular o del organismo completo. Por ello, los avances realizados en este campo si bien son significativos, resultan ser aproximaciones o evidencian alteraciones radicales debido a las mutaciones. No obstante, pequeñas modificaciones que alteren de forma menos dramática los fenotipos, pero que resulten fundamentales para el correcto funcionamiento del sistema de endomembranas son mucho más complicadas de analizar con estos métodos asociados al “todo o nada” de la genética clásica.

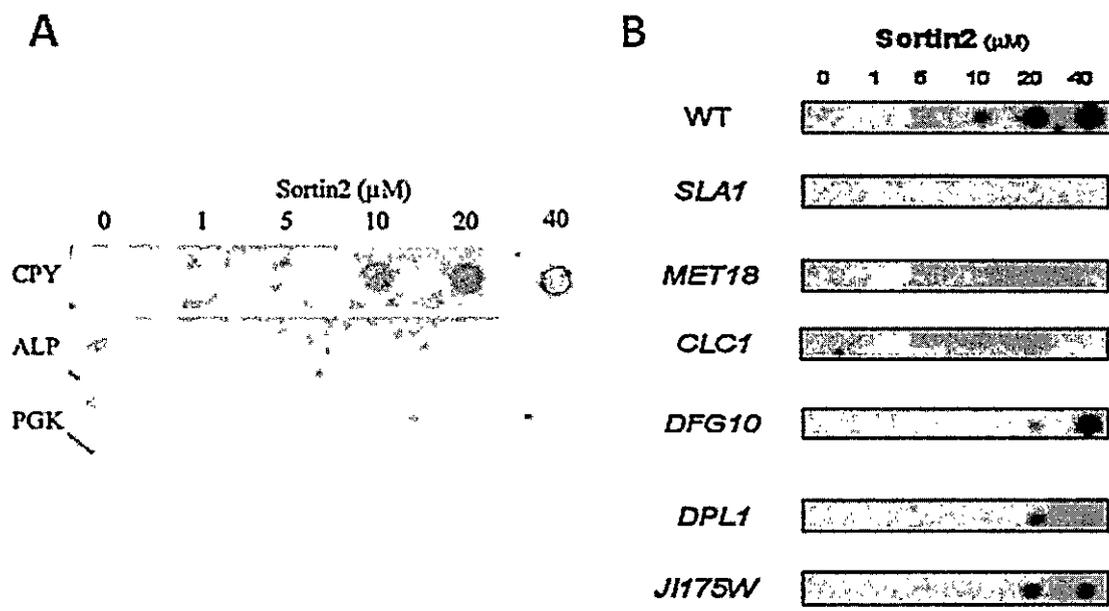
En este contexto, la asociación de la química con la genética ha dado pie al surgimiento de una nueva disciplina: la genómica química, el estudio de los genes utilizando compuestos químicos, naturales o sintéticos, los cuales tiene actividad biológica y actúan como biomoduladores. Estos biomoduladores tienen la particularidad que pueden asociarse de forma reversible a uno o más blancos celulares o moleculares, sorteando así las ley del “todo o nada” antes mencionada evitando así la inviabilidad por defecto, debido a que generan un efecto dosis-dependiente. Y también la redundancia génica, otro problema de la genética clásica, pues su blanco molecular puede ser un grupo o familia de proteínas. Lo que puede generar falsos negativos si se estudia la delección de un gen en particular, que tenga redundancia génica.

### 1.5. Sorting Inhibitors (Sortins): Biomoduladores del tráfico vesicular

En la búsqueda de compuestos que tengan actividad biológica para ser usados como potenciales biomodulares, Zohuar et al (2004), encontraron catorce compuestos que alteran la correcta destinación de proteínas a través del sistema de endomembranas. Ésta búsqueda se realizó sobre una base de cinco mil compuestos diferentes, siendo denominados Sortins (del inglés Sorting Inhibitors) aquellos compuestos que alteraban el tráfico normal de la CPY desde la TGN hacia la vacuola, enviándola al medio extracelular, lo que no ocurre en la destinación de ALP o la Fosfoglicerato kinasa (PGK).

Con el objeto de establecer los posibles mecanismos de acción y caracterizar los efectos de los distintos Sortins, en particular de Sortin2, se realizó un análisis de secreción de CPY en una librería indexada de mutantes haploides de *S. cerevisiae*. Producto de esto, se encontraron cepas que presentaban hipersensibilidad, determinada en virtud de la dosis de biomodulador necesaria para gatillar la secreción de la proteína CPY respecto de una cepa silvestre; y otras cepas de levaduras que presentaban resistencia considerando éstos mismos parámetros, es decir, la secreción de CPY hacia el medio extracelular se gatillaba a concentraciones mayores de biomodulador respecto de lo requerido para generar el mismo efecto en una cepa silvestre.

La colección utilizada consta de 4.800 cepas delecionales de *S. cerevisiae* y aquellas que presentaban resistencia se caracterizan por que el producto génico codificado en el gen que presenta la mutación, participa de manera directa o indirecta en mecanismos asociados al SE, destacando particularmente la presencia de los genes que codifican para CLC y una proteína accesoria, directamente involucrada en la formación de vesículas con cubierta de clatrina, codificada por el gen *sla1*.



**Figura 3. Secreción de CPY en cepas de *S. cerevisiae* bajo tratamiento con Sortin2.** En A se observa dot blot que indica la presencia de CPY extracelular, en cultivos de *S. cerevisiae* tratadas con distintas concentraciones de Sortin2. En B se observa dot blot de distintas cepas mutantes de *S. cerevisiae* que indica resistencia parcial o total al efecto de Sortin 2 que gatilla la secreción de CPY. (A.- Norambuena et al, *BMC Chemical Biology* 2008; B.- Datos no publicados)

En este contexto, el biomodulador Sortin2 podría actuar en las rutas de endocitosis, exocitosis y tráfico vesicular intracelular, afectando así la destinación de proteínas y con ello, alterar procesos fisiológicos importantes en los organismos que requieren de un correcto funcionamiento del sistema de endomembranas. Por lo tanto, el uso de la genómica química permite estudiar procesos que son vitales para la célula y con ello para los organismos, lo que resulta muy limitado mediante el uso de técnicas convencionales. De esta forma, el desarrollo, estudio y uso de estos nuevos biomoduladores permitiría, además, comprender nuevas aristas sobre el sistema de endomembranas en distintos organismos.

En el presente seminario de título, analizamos el efecto del biomodulador Sortin2 en los procesos endocíticos de cepas de *S. cerevisiae* silvestres y en mutantes únicas haploides, en las cuales se observó resistencia parcial o total al biomodulador, según los análisis de secreción de CPY, de manera de poder establecer alguna relación entre los productos

génicos de los genes delecionados y el efecto del biomodulador. Además se intentará homologar lo observado en levaduras, en líneas mutantes de *A. thaliana*, de manera de poder establecer en ambos organismos algunos posibles blancos moleculares del biomodulador.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

- Estudiar el efecto de Sortin2 en la endocitosis en *S. cerevisiae* y *A. thaliana* y evaluar el posible rol de proteínas asociadas a este proceso.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar los procesos endocíticos en cepas de *S. cerevisiae*, que presentan resistencia a Sortin2, mediante la internalización de un trazador fluorescente y el uso de análogos estructurales.
- Búsqueda de mutantes insercionales de *A. thaliana*, que posean niveles alterados de expresión en genes ortólogos a *clc1* y *sla1* y caracterización genotípica de éstas.
- Caracterizar los procesos endocíticos en mutantes insercionales de *A. thaliana* para los genes ortólogos a *clc1* y *sla1*, mediante la internalización de un trazador fluorescente.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Crecimiento de levaduras**

Las levaduras son crecidas en placas de Petri con YPD sólido, directamente desde el tubo con glicerol e incubadas a 30° durante 72 horas. Luego, una colonia aislada es picada e incubada en 10 mL de YPD líquido durante 48 horas a 30°C con agitación constante. Esta suspensión se denomina pre-inóculo el que se diluye 200 veces en YPD líquido, para dar origen al inóculo, el cual será utilizado en los ensayos posteriores. Es preciso señalar que este inóculo debe estar fresco, por lo que debe prepararse antes de cada ensayo y/o tratamiento.

#### **3.2. Tratamiento de Sortin2 y sus análogos estructurales en levaduras**

El inóculo es incubado en condiciones Control, con un 1% de DMSO presente en el medio, y de Tratamiento, con Sortin2 20  $\mu$ M y 1% DMSO adicionado al medio. La incubación se realiza en duplicado, en placas de 96 pocillos, en oscuridad, a 30°C y con agitación constante durante 72 horas. El volumen final en cada pocillo no debe superar los 200  $\mu$ L.

Los tratamientos con los análogos estructurales de Sortin2, fueron realizados de la misma forma descrita, utilizando las siguientes concentraciones. Análogo 1: 40  $\mu$ M; Análogo 2: 80  $\mu$ M; Análogo 3: 20  $\mu$ M; Análogo 3: 40  $\mu$ M.

### **3.3. Tratamiento FM4-64 en levaduras**

Luego de la incubación del inóculo en las distintas condiciones, se debe resuspender suavemente y mezclar en un tubo eppendorf con el FM4-64. Los volúmenes utilizados fueron 40  $\mu\text{L}$  de inóculo y 40  $\mu\text{L}$  de FM4-64 48  $\mu\text{M}$ , por lo que se obtiene un volumen de 80  $\mu\text{L}$  y una concentración de 24  $\mu\text{M}$  de FM4-64. La solución obtenida, debe ser incubada a 4°C por aproximadamente 30 minutos antes de comenzar con el seguimiento de la endocitosis del trazador.



### **3.4. Evaluación de la endocitosis en levaduras mediante microscopía confocal**

Las levaduras tratadas con FM4-64 fueron visualizadas inmediatamente después de la incubación en hielo, tiempo 0. Luego fueron lavadas, puestas en 80  $\mu\text{L}$  de YPD líquido fresco e incubadas en seco a 30°C, para posteriormente ser visualizadas a los 15, 25, 40 y 60 minutos de incubadas. En algunos casos, se utilizó Concanavalina-A para la evitar el movimiento de las levaduras en el portaobjeto y favorecer su visualización. Se utilizó el Microscopio Confocal Zeiss LSM 510 de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, utilizando un láser de excitación con una longitud de onda de 543 nm, con un filtro de captura de 560 nm y analizadas con el programa LSM Image Browser.

### **3.5. Esterilización y crecimiento de *A. thaliana***

Para esterilizar las semillas, en esterilidad, se lavaron las semillas en 1 mL de etanol 95% v/v por 5 minutos. Luego se retiró esta solución y se agregó etanol 70% v/v con Tritón®X-

100 0,1% v/v durante 15 minutos en agitación. Finalmente las semillas se lavaron 5 veces en 1 mL de agua estéril, retirando cada vez el líquido. Las semillas se estratificaron en oscuridad y a 4°C en 1 mL de agua estéril por 2 días.

Las semillas fueron sembradas en placas de petri que contenían medio de cultivo MS sólido. El medio estaba compuesto por sacarosa 2% p/v, mioinositol 0,01% p/v, MES [ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato] 0,05% p/v, medio de cultivo Murashige y Skoog 0,44% p/v y agar agar 0,7% p/v, ajustado a pH 5,7. Las placas se dejaron incubación por 21 días con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, y 22°C de temperatura.

Luego de los 21 días las plantas fueron trasplantadas a un soporte de lana de roca (Grodan®), el cual fue puesto en un contenedor con medio de cultivo hidropónico 1X (Gibeaut D.M. et al, 1997). Su versión 100X se compone de KNO<sub>3</sub> 125 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 150 mM, MgSO<sub>4</sub> 75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5 mM, MnSO<sub>4</sub> 1 mM, ZnSO<sub>4</sub> 200 μM, CuSO<sub>4</sub> 150 μM, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 10 mM y Sprint 330 7,7 mM [Fe quelado en DTPA (Ácido di-etilen-tri-amino-pentaacético)]; ajustado a pH 5. Las plantas se crecieron a 22°C de temperatura y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad para su posterior recolección de semillas.

### **3.6. Extracción de DNA de plantas de *A. thaliana***

A plantas de *A. thaliana* de 21 días de edad se le extrajeron algunas hojas tipo roseta desde las cuales se extrajo el DNA genómico. Para ello se molieron aproximadamente 100 mg de tejido en nitrógeno líquido. El tejido molido se incubó 60 minutos en baño termostático

a 65°C en una solución tampón CTAB 2X (cetil-trimetil-amonio-bromidío 2% p/v, NaCl 1,4M, Tris HCl pH 8 100 mM, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,1% v/v) y se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se le adicionaron 700 µL de una solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 8.000 rpm por 5 minutos, se rescató la fase superior y se repitió el procedimiento. Luego se adicionaron 650 µL de 2-propanol, se incubó por 60 minutos a -20°C y se centrifugó por 15 minutos a 13.000 rpm para formar un pellet con el DNA. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70% v/v, se centrifugó brevemente, se removió el etanol y se dejó secar el pellet. Para conservar el DNA extraído se adicionaron 50 µL de una solución tampón que contiene Tris HCl pH8 10mM y EDTA 1 mM y se almacenó a -20°C.

### **3.7. Genotipificación por PCR y expresión de genes ortólogos en *A. thaliana***

Para las reacciones de PCR, se ocupó 1 µL del DNA genómico extraído según el punto anterior, 2,5 µL de una solución tampón 10X con MgCl<sub>2</sub> 2mM, 1 µL de cada partidor 10 µM, 0,2 µL Paq5000<sup>TM</sup> DNA polimerasa 5U/µL (Stratagene®), 0,5 µL solución de dNTPs 10 mM cada uno y 18,8 µL de agua, totalizando 25 µL de volumen final.

La electroforesis de DNA se realizó a 100V por 45 minutos en geles de agarosa al 1,5% p/v en TAE 1X (Tris-base pH 8 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA pH 8 1mM). En cada pocillo se cargaron 5 µL de muestra mezclada con 1 µL de solución de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v, ficol 30% p/v). Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler<sup>TM</sup> 1Kb a 50 ng/µL. Para revelar la muestra, se incubó el gel en

bromuro de etidio 2 mg/L por 20 minutos y se observó en transiluminador SYNGENE modelo SYDR/2082.

### **3.8. Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó mediante kit comercial “SV Total RNA Isolation System” de Promega®. El RNA extraído fue analizado en espectrofotómetro “Nanodrop 100” de Thermo Scientific®. La concentración de RNA de la solución y los valores de absorbancia observados se encontraban dentro de lo establecido en el protocolo. En relación a estos datos, se prosiguió con el RT-PCR y la posterior semi-cuantificación.

### **3.9. Semi-cuantificación de mRNA en *A. thaliana***

Considerando la concentración de RNA obtenido en el paso anterior, se realizó un RT-PCR y a partir del cDNA obtenido, se amplificó un gen de expresión constitutiva como el que codifica la proteína de Actina y los genes ortólogos de *clc*, At2g40060, At3g51890 y At2g20760. La semi-cuantificación se realizó mediante densitometría, utilizando el programa ImageJ.

### **3.10. Tratamiento control y con Sortin2 en *A. thaliana***

Las líneas mutantes analizadas, Salk\_131789 y Salk\_059605, fueron crecidas durante 7 días en ambiente con fotoperiodo y temperatura controladas, en placas que contenían medio MS sólido en condiciones Control 1% DMSO y Tratamiento 116  $\mu\text{M}$  Sortin2

### **3.11. Tratamiento con FM4-64 y microscopía confocal en *A. thaliana***

Plantas de 7 días fueron incubadas a 4°C, durante 10 minutos con FM4-64 a 5  $\mu\text{M}$ . Luego fueron visualizadas a los 0, 60 y 120 minutos después de la incubación en el Microscopio Confocal Zeiss LSM 510 de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, utilizando un láser de excitación de 543 nm, con un filtro de captura de 560 nm y analizadas con el programa LSM Image Browser.

#### **4. RESULTADOS**

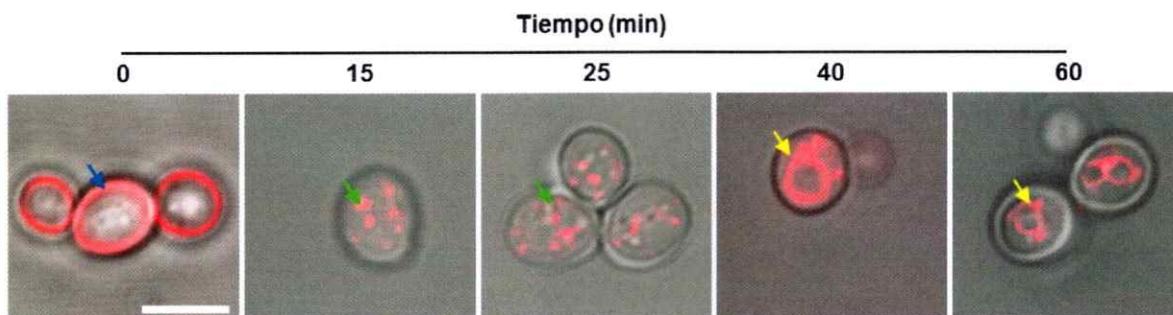
##### **4.1. Caracterizar los procesos endocíticos en cepas de *S. cerevisiae*, que presentan resistencia a Sortin2, mediante la internalización de un trazador fluorescente y el uso de análogos estructurales**

Como se expuso en los antecedentes, estudios anteriores demostraron que Sortin2 afecta la destinación de la proteína vacuolar CPY, la cual es secretada al medio extracelular, encontrándose seis cepas mutantes de *S. cerevisiae* que presentan una resistencia parcial o total a este efecto (Zohuar J. 2004; Norambuena L. 2008). Frente a la participación directa o indirecta de los productos génicos de estos genes, cuya delección confiere resistencia a Sortin2, en el proceso de endocitosis y a la conocida relación existente entre algunos componentes de la ruta secretoria y endocítica, se decidió visualizar los posibles efectos de Sortin2 en el proceso de endocitosis en *S. cerevisiae*. Para esto se utilizó el marcador fluorescente FM4-64, el cual se asocia a la membrana plasmática y es endocitado por la maquinaria celular (Vida T., 1995). De esta forma se pudo realizar un seguimiento del marcador a lo largo del tiempo, mediante microscopia confocal, observando su localización en los distintos compartimentos subcelulares, hasta la vacuola, donde se localiza como destino final (Vida T., 1995).

Luego de incubar las levaduras con el marcador y de visualizar su localización en la membrana plasmática, se realizó el seguimiento del trazador durante sesenta minutos. Las levaduras fueron analizadas en condiciones control y bajo el tratamiento con Sortin2 a las que fueron sometidas las levaduras para determinar la secreción de CPY (Figura 3-B).

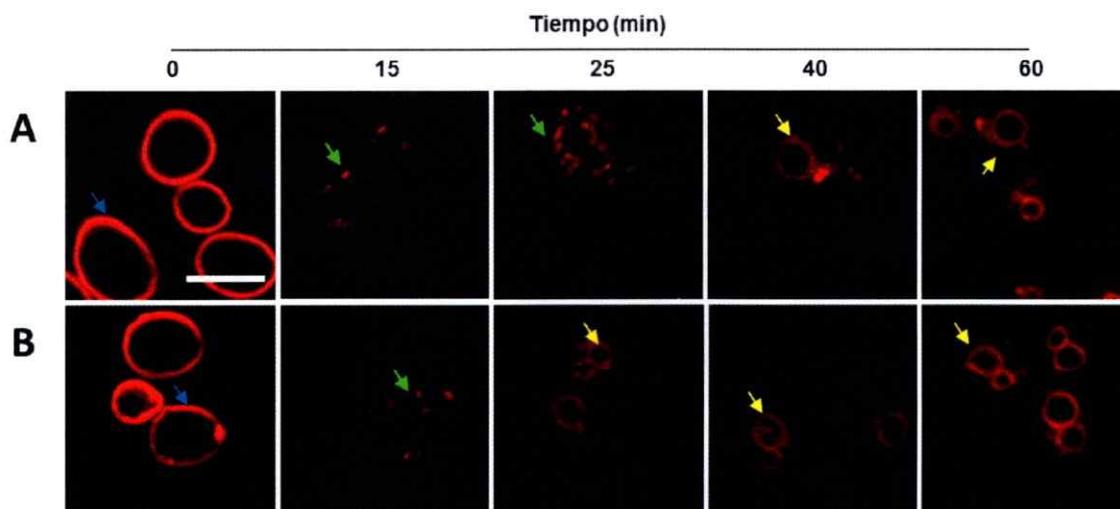
#### 4.1.1. Efecto de Sortin2 en la endocitosis del marcador fluorescente FM4-64 en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*

En la Figura 4 se muestra, mediante microscopía confocal, la localización subcelular del trazador de endocitosis FM4-64 en *S. cerevisiae*, visualizándose asociado a la membrana plasmática a tiempo cero de incubación a la temperatura que la endocitosis es inactiva (0°C). Luego de 15 minutos de incubación a 30°C, se observan pequeñas estructuras punteadas al interior de la célula que corresponden a endosomas; 25 minutos después de iniciado el seguimiento, aún se observan estas estructuras punteadas. No obstante, luego de 40 minutos de observación, el marcador fluorescente se asocia a la membrana vacuolar, observándose estructuras redondeadas al interior de la levadura. A tiempos posteriores se observan las mismas estructuras circulares correspondientes a vacuola lo que muestra que el trazador no recicla desde la membrana vacuolar. Esta cinética de internalización del marcador FM4-64 ha sido descrita en publicaciones anteriores (Vida T., 1995) y coincide plenamente con lo observado en este trabajo, tanto en las estructuras como en la temporalidad de la endocitosis.



**Figura 4. Cinética de internalización de FM4-64 en *S. cerevisiae* silvestre.** Imágenes de microscopía confocal que muestran la localización subcelular del trazador de endocitosis FM4-64 en levaduras durante 60 minutos. Se observa que en tiempo cero el trazador se encuentra asociado a la membrana plasmática (flecha azul), mientras que 15 y 25 minutos después de iniciado el seguimiento, se localiza en pequeñas estructuras circulares, que corresponderían a endosomas (flecha verde). Luego de 40 minutos, el trazador se visualiza en una estructura circular mayor, que corresponde a la vacuola (flecha amarilla). Barra 5  $\mu$ m.

En la Figura 5 se observa que la internalización del trazador en levaduras bajo tratamiento con Sortin2 el marcador alcanza la membrana vacuolar a un menor tiempo, sugiriendo una aceleración en el proceso endocítico. Esta diferencia en la velocidad de internalización del marcador queda de manifiesto al observarse la localización del marcador 25 minutos luego de iniciado el seguimiento, pues en condiciones control se observa el marcador asociado a la membrana de los compartimentos endosomales, mientras que en aquellas levaduras que fueron tratadas con el biomodulador el marcador se visualiza en el perímetro de un compartimento circular de mayor tamaño, que dada su morfología y las características del marcador corresponde a la vacuola. Según estas observaciones, Sortin2 afecta al sistema de endomembranas en los procesos de tráfico vesicular y en la endocitosis, provocando en éste último mecanismo un tráfico acelerado desde la membrana plasmática hacia la vacuola.



**Figura 5. Efecto de Sortin2 en la endocitosis de FM4-64.** En **A**, levaduras en tratamiento control con 1% DMSO y en **B** levaduras tratadas con Sortin2 20  $\mu$ M, ambas fueron incubadas 72 horas antes de ser evaluadas. En **B** se observa la aceleración la endocitosis del trazador FM4-64, pues alcanza la membrana vacuolar (flechas amarillas) a un tiempo menor (25 min), respecto de la condición control (40 min). En ambos casos se observa el trazador en compartimentos endosomales (flechas verdes) luego de 25 min de iniciado el seguimiento y en la membrana plasmática a tiempo cero (flechas azules). Barra 5  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Internalización del marcador FM4-64 en mutantes haploides de *S. cerevisiae*

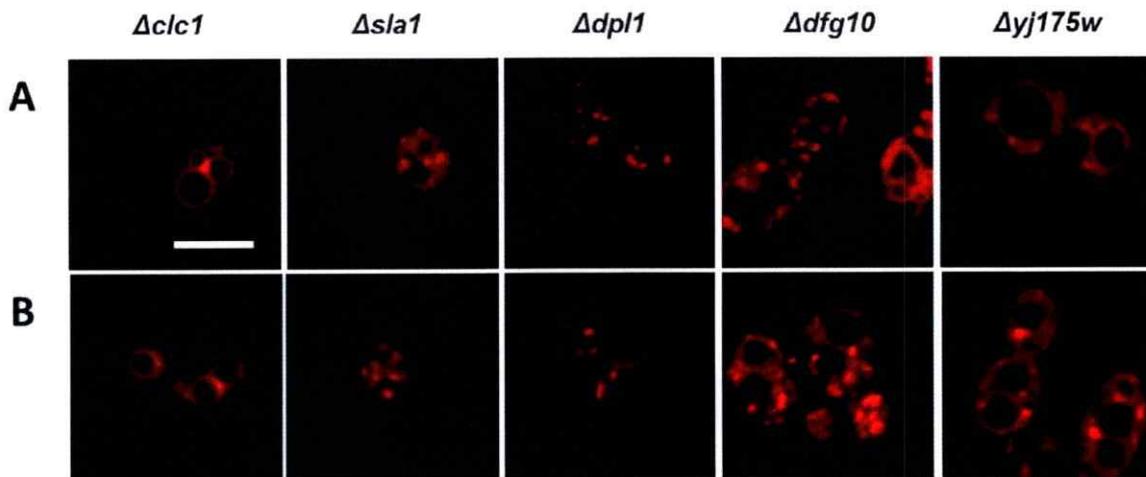
A raíz de la alteración observada en los procesos de endocitosis y de antecedentes previos del laboratorio, donde se han identificado algunas mutantes delecionales de levaduras que no secretan CPY al medio extracelular en presencia de Sortin2 (Norambuena y col, datos no publicados); se decidió visualizar el efecto de Sortin2 en la cinética de internalización del mismo marcador fluorescente FM4-64, en dichas cepas resistentes, con el objeto de relacionar la acción del biomodulador, con algunos de los productos génicos ausentes en estas mutantes. Para esto, se realizó el mismo procedimiento de tratamiento que en la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (Figura 5), en aquellas cepas que presentaban deleciónado los genes *clc1*, *slal*, *dpl1*, *dfg10*, *ypk1* e *yjl175w*, respectivamente (Tabla1).

Como se observó en el punto anterior, el biomodulador Sortin2 acelera la endocitosis del trazador FM4-64 en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Sin embargo, al realizarse el mismo tratamiento en las seis cepas resistentes a Sortin2, la cinética de internalización del marcador no varió en la condición de tratamiento respecto de la condición control como lo hace en la cepa silvestre (Figura 5). Esto se puede observar en la Figura 6 donde se presenta un tiempo representativo del seguimiento realizado al trazador (25 minutos), en cada una de las cepas bajo condiciones control y de tratamiento con Sortin2. Se consideró este tiempo pues es en el cual se visualiza claramente la diferencia en la localización subcelular del trazador en la cepa silvestre (Figura 5).

Gen/ORF	GO Función	GO Proceso	GO Componente	Referencias
SLA1 YBL007C	Proteína de unión, puente <sup>1</sup> Unión a ubiquitina <sup>2</sup> Unión a actina <sup>3</sup> Proteína de unión a citoesqueleto <sup>4</sup> Unión a proteínas idénticas <sup>2</sup>	Ensamblaje del parche cortical de actina <sup>5</sup> Endocitosis <sup>6</sup> Organización en la pared celular de tipo fúngico <sup>5</sup>	Parche cortical de actina <sup>7</sup> Corteza celular <sup>1</sup> Núcleo <sup>8</sup> Proyección de acoplamiento <sup>9</sup> Citoesqueleto <sup>3</sup> Membrana endosomal <sup>3</sup> Membrana plasmática <sup>3</sup>	<sup>1</sup> Warren et al., 2002 <sup>2</sup> Stamenova et al., 2007 <sup>3</sup> UniProt-GOA, 2011 <sup>4</sup> DDB et al., 2001. <sup>5</sup> Pruyne and Bretscher, 2000 <sup>6</sup> Howard et al., 2002 <sup>7</sup> Ayscough et al., 1999 <sup>8</sup> Gardiner et al, 2007 <sup>9</sup> Narayanaswamy et al., 2009
CLC1 YGR167W	Actividad estructural en la molécula <sup>1</sup> Unión a Calmodulina <sup>2</sup> Actividad estructural en la molécula <sup>3</sup>	Endocitosis <sup>4</sup> Transporte mediado por vesículas <sup>1,3</sup> Transporte intracelular de proteínas <sup>3</sup>	Revestimiento en vesículas de Clatrina <sup>1</sup> Revestimiento en las hendiduras cubiertas de Clatrina <sup>3</sup> Revestimiento de Clatrina en vesículas de la red trans-Golgi <sup>3</sup>	<sup>1</sup> Pishvae et al., 1997. <sup>2</sup> UniProt-GOA, 2011. <sup>3</sup> DDB et al., 2001. <sup>4</sup> Newpher and Lemmon, 2006
MET18 YIL128W	Unión <sup>5</sup>	Proceso metabólico de la Metionina <sup>1</sup> Reparación de la escisión de nucleótidos <sup>2</sup> Promotor de la transcripción de la RNA polimerasa II <sup>3</sup> Reparación del DNA <sup>6</sup> Respuesta a estímulos dañinos del DNA <sup>6</sup> Transcripción dependiente de DNA <sup>6</sup>	Citoplasma <sup>4</sup> Núcleo <sup>6</sup>	<sup>1</sup> Masselot and De Robichon-Szulmajster, 1975. <sup>2</sup> Kou et al., 2008. <sup>3</sup> Lauder et al., 1996. <sup>4</sup> Huh et al., 2003. <sup>5</sup> DDB et al., 2001. <sup>6</sup> UniProt-GOA, 2011.
DFG10 YIL049W	Actividad 3-oxo-5-alfaesteroide - 4-deshidrogenasa <sup>1</sup> Actividad oxidoreductasa, actúa en grupos donantes CH-CH <sup>5</sup>	Biosíntesis de Dolicol <sup>1</sup> Crecimiento Pseudohifa <sup>2</sup> Metabolismo de lípidos <sup>5</sup>	Integral de membrana <sup>3,4,5</sup> Membrana de retículo endoplásmico <sup>4</sup>	<sup>1</sup> Cantagrel et al., 2010. <sup>2</sup> Mosch and Fink, 1997. <sup>3</sup> De Hertogh et al., 2002. <sup>4</sup> UniProt-GOA, 2011. <sup>5</sup> DDB et al., 2001.
DPL1 YDR294C	Actividad Esfingosina-1-fosfato aldolasa <sup>1</sup> Actividad Carboxiliasa <sup>6</sup> Unión Piridoxal fosfato <sup>6</sup>	Señalización mediada por calcio <sup>2</sup> Respuesta celular a inanición <sup>3</sup> Metabolismo de esfingolípidos <sup>1</sup> Metabolismo de ácido carboxílico <sup>6</sup>	Retículo endoplásmico <sup>4,5</sup>	<sup>1</sup> Saba et al., 1997. <sup>2</sup> Birchwood et al., 2001. <sup>3</sup> Gottlieb et al., 1999. <sup>4</sup> Mukhopadhyay et al., 2008 <sup>5</sup> Huh et al., 2003. <sup>6</sup> DDB et al., 2001.
YJL175W YJL175W	Desconocido	Desconocido	Integral de membrana <sup>1</sup>	<sup>1</sup> De Hertogh et al., 2002.

**Tabla 1. Ontología Génica (GO) de genes cuya delección provoca resistencia a Sortin 2 en *S. cerevisiae*.** Para cada gen, se muestra proceso biológico en el que está involucrado, función molecular y componente celular asociado.

Cada cepa mutante posee una cinética de endocitosis propia, la cual no se ve afectada por la presencia de Sortin2 en su medio de crecimiento. De esta manera, si bien existe una diferencia en la cinética de internalización en algunas mutantes respecto de la cepa silvestre, esto no se debería al efecto del compuesto químico, sino que es atribuible a la mutación, pues dicha diferencia es observable en condiciones control, donde no existe presencia del biomodulador.



**Figura 6. Sortin2 no afecta la endocitosis del marcador en cepas mutantes de *S. cerevisiae*.** En A, cepas mutantes en tratamiento control con 1% DMSO y en B cepas mutantes tratadas con Sortin2 20  $\mu$ M. Ambas fueron incubadas 72 horas antes de ser evaluadas. Se observa que en tratamiento con Sortin2 no se altera la internalización de respecto de la condición control pues el trazador se localiza en el mismo compartimento subcelular. Se presenta sólo un tiempo representativo del seguimiento, 25 minutos en todas las muestras. Barra 5  $\mu$ m

#### **4.1.3. Tratamientos con análogos estructurales de Sortin2 y efecto en la endocitosis de las distintas cepas resistentes a Sortin2**

Una vez establecido que las cepas mutantes que presentaban resistencia parcial o total al efecto de Sortin2 sobre la destinación de CPY también presentaban resistencia al efecto del compuesto químico sobre la endocitosis, se decidió estudiar el efecto de algunos análogos estructurales del biomodulador en la endocitosis de dos de las cepas mutantes, cuyos genes delecionados participarían en ambos procesos afectados por Sortin2. Esto para determinar la especificidad del biomodulador y si alguno de los análogos estructurales genera los mismos efectos de Sortin2.

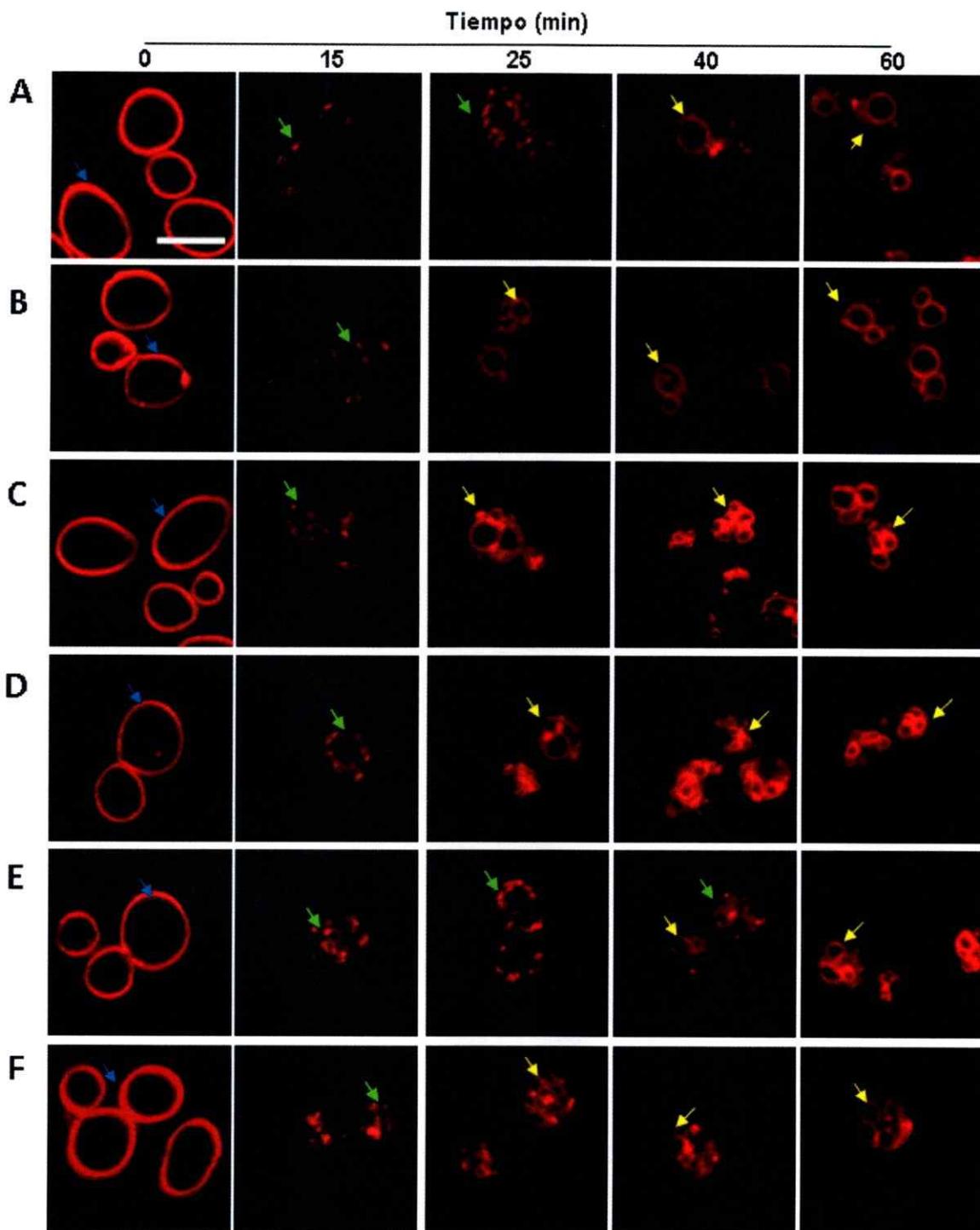
Las cepas utilizadas son: la mutante delecional para *clc1*, cuyo producto génico forma parte de la cubierta de clatrina que envuelven aquellas vesículas que transportan CPY desde la TGN hasta la vacuola y aquellas que internalizan distintos cargos desde el medio hacia el intracelular (Galleta B., 2009). Además la mutante delecional para el gen *sla1*, cuya proteína permite estabilizar complejos proteicos asociados al citoesqueleto con las vesículas de clatrina en formación, por lo que también participa de manera directa en ambos procesos fisiológicos. Centramos nuestro análisis en estas dos cepas mutantes pues los genes que se presentan delecionados, codifican para proteínas que están estrechamente relacionadas con procesos importantes tanto para la destinación de proteínas vacuolares, como CPY, así como también para el proceso de endocitosis, por lo que se postulan como posibles blancos moleculares de Sortin2.

Para realizar este análisis se utilizaron cuatro análogos estructurales de Sortin2, cuyas diferencias radican en la sustitución o la remoción de algunos grupos reactivos. La bioactividad de estos químicos había sido previamente descrita por la Dra. Norambuena



observando su capacidad para gatillar la secreción de CPY. Con base en estos estudios previos, las concentraciones a utilizar de cada análogo estructural fue: el doble de la concentración de Sortin2, en aquellos que no presentaban bioactividad y la misma concentración que gatillaba la secreción de CPY en aquellos que presentaban bioactividad.

Para determinar los efectos de los análogos estructurales en la endocitosis, se visualizó la localización subcelular del marcador fluorescente FM4-64 a distintos tiempos, en levaduras tratadas con cada uno de los diferentes análogos (Figura 7). De esta manera se observó que la cinética de internalización del marcador en las cepas control de *S. cerevisiae*, bajo tratamiento con los denominados Químicos 1, 2 y 4 es igual a la de Sortin2; acelerando el proceso de endocitosis, pues la fluorescencia observada se localiza en la membrana vacuolar, 25 minutos después de su localización en la membrana plasmática (Figura 7).

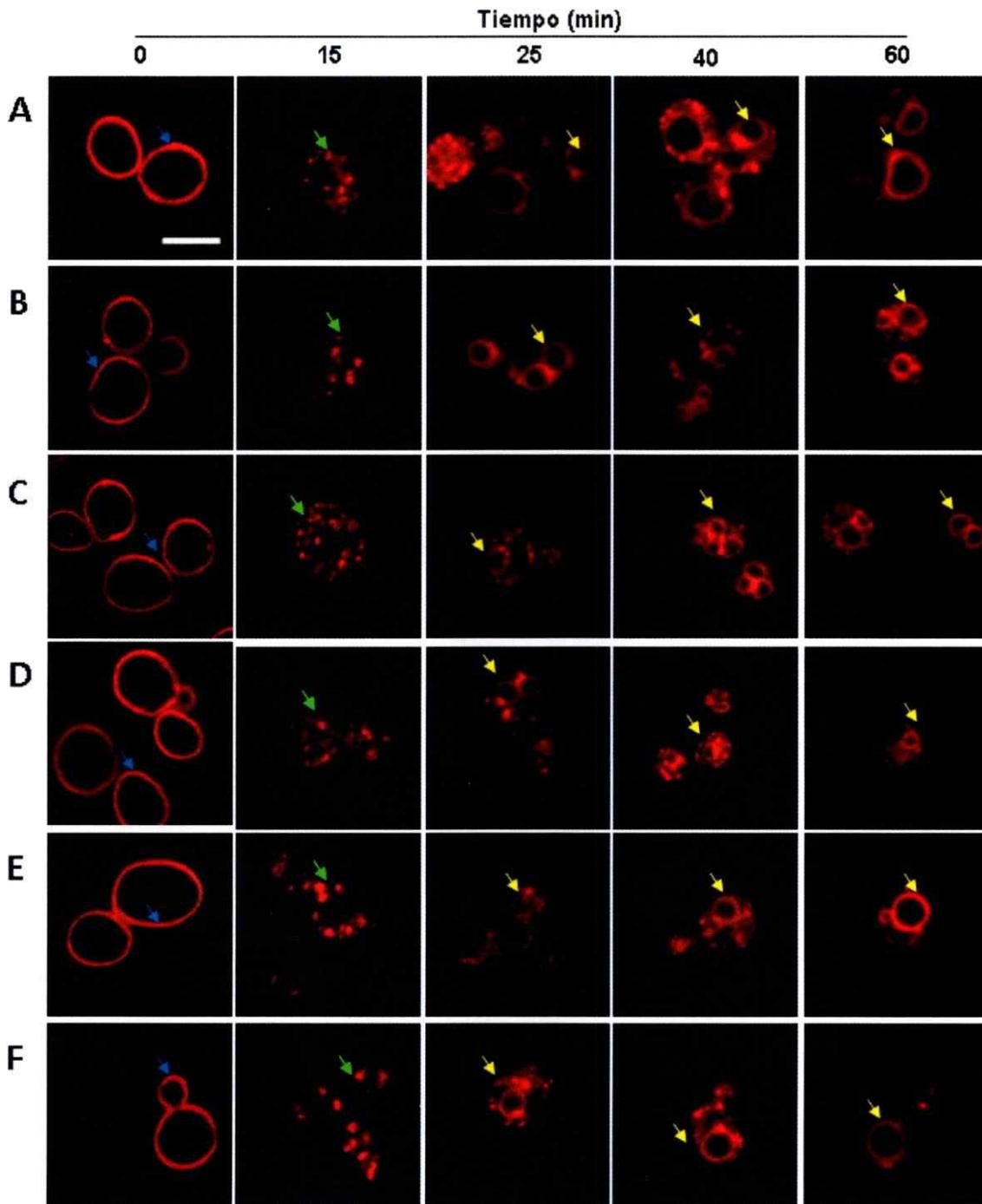


**Figura 7. Efecto de los análogos estructurales de Sortin2 en la endocitosis del trazador FM4-64.** En **A**, levaduras en tratamiento control con 1% DMSO, en **B** levaduras tratadas con Sortin2 20  $\mu$ M, en **C** levaduras tratadas con el análogo 1 40  $\mu$ M, en **D** levaduras tratadas con el análogo 2 80  $\mu$ M, en **E** levaduras incubadas con análogo 3 20  $\mu$ M y en **F** levaduras tratadas con análogo 4 40  $\mu$ M. Todas fueron incubadas 72 horas antes de ser evaluadas. Según la cinética observada, los análogos estructurales de Sortin2: 1, 2 y 4 mantienen su bioactividad, mientras que el análogo 3 presenta una cinética de endocitosis similar al control. Flechas azules indican la asociación del trazador a la membrana en tiempo cero, las flechas verdes señalan la localización endosomal del trazador, mientras que las flechas amarillas señalan al trazador asociado a la membrana vacuolar. Barra 5  $\mu$ m.

En las cepas mutantes analizadas, *Δclc1* y *Δslal*, no existe referencia acerca de la alteración de la destinación de la proteína CPY, en presencia de análogos estructurales de Sortin2. No obstante aquello, los análisis de internalización del marcador fluorescente FM4-64 fueron realizados de manera tal de esclarecer los posibles grupos químicos importantes en la bioactividad de los compuestos. Como se observa en la Figura 8 en la cepa *Δclc1*, ningún químico provoca una alteración visible en la internalización del marcador fluorescente FM4-64, puesto que la cinética de endocitosis es similar en los distintos tratamientos. De esta manera, en todos los tratamientos (Control, Sortin2 y los cuatro análogos estructurales), el marcador se encuentra asociados a compartimentos sub-celulares de iguales características en los mismos tiempos de registro utilizados.

Esto podría indicar que el producto codificante del gen *clc1* sería el blanco molecular de Sortin2 y en todas las condiciones se visualiza el fenotipo predominante de la delección del gen, puesto que la cinética de internalización del marcador es la misma que en condiciones control (Figura 8).

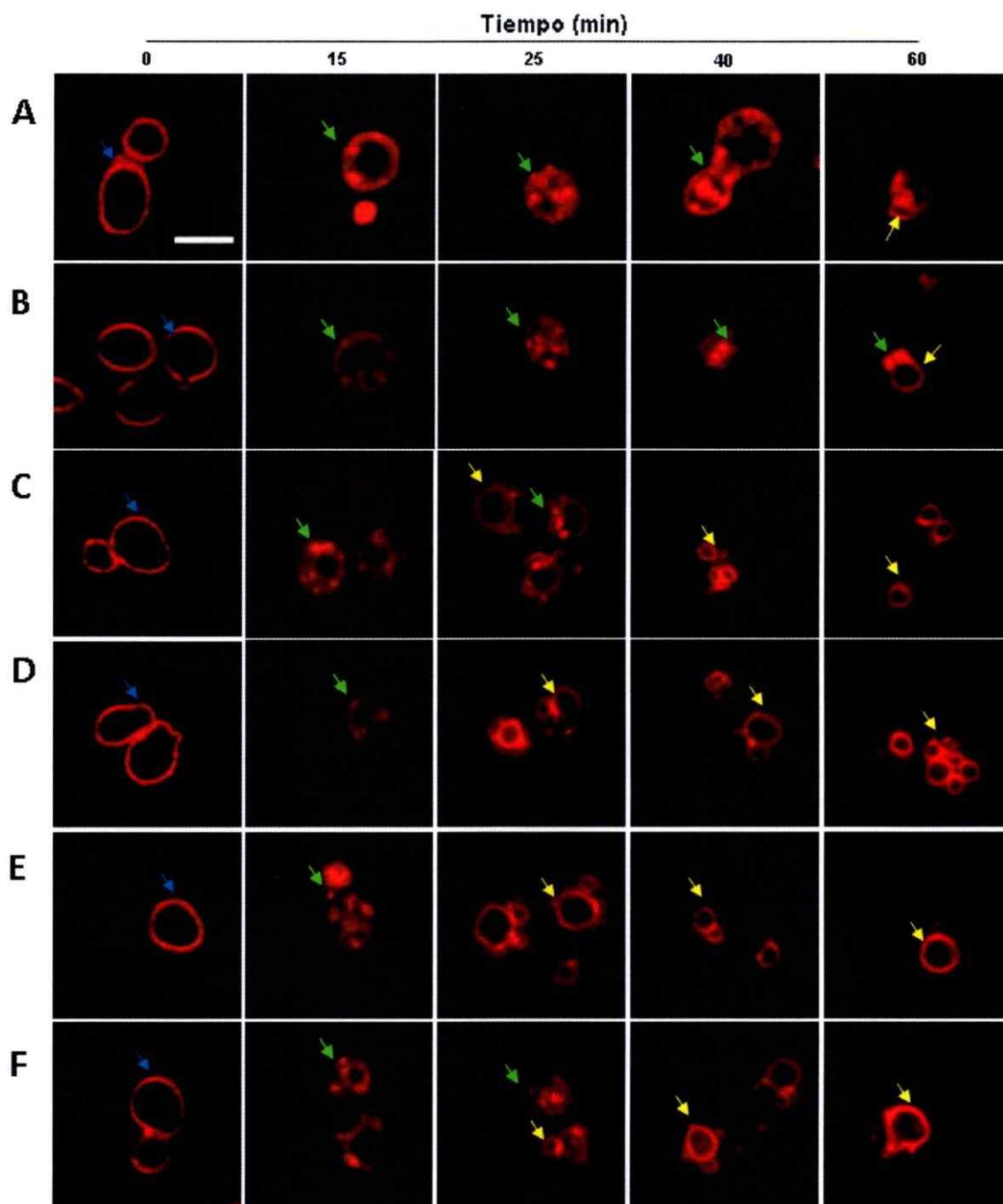
En la otra cepa mutante de interés, *Δslal*, se observó en condiciones de tratamiento control, un retraso en la velocidad de internalización del marcador, lo que concuerda plenamente con lo descrito en la literatura pues, se sabe que la delección del gen *slal*, genera una alteración de la endocitosis en levaduras, disminuyendo la tasa de internalización de algunos co-factores y otros marcadores fluorescentes como el Amarillo Lucifer, un marcador de endocitosis de fase fluida, que tiene por destino el compartimento vacuolar (Warren D., 2009).



**Figura 8. Efecto de los análogos estructurales de Sortin2 en la endocitosis del marcador FM4-64 en la cepa *Δclc1* de *S. cerevisiae*.** En **A**, levaduras en tratamiento control con 1% DMSO, en **B** levaduras tratadas con Sortin2 20  $\mu\text{M}$ , en **C** levaduras tratadas con el análogo 1 40  $\mu\text{M}$ , en **D** levaduras tratadas con el análogo 2 80  $\mu\text{M}$ , en **E** levaduras incubadas con análogo 3 20  $\mu\text{M}$ , y en **F** levaduras tratadas con análogo 4 40  $\mu\text{M}$ . Todas fueron incubadas 72 horas antes de ser evaluadas. Según la cinética observada, los análogos estructurales de Sortin2 no presentan diferencias evidentes en cuanto a la internalización del trazador. Flechas azules indican la asociación del trazador a la membrana en tiempo cero, las flechas verdes señalan la localización endosomal del trazador, mientras que las flechas amarillas señalan al trazador asociado a la membrana vacuolar. Barra 5  $\mu\text{m}$ .

Al igual que lo observado en el ensayo de secreción de CPY, donde Sortin2 no gatilla la destinación de esta proteína al medio extracelular, en la cepa *Δslal* el análisis de internalización del trazador FM4-64 no presenta alteraciones en tratamiento con Sortin2, observándose el marcador en iguales compartimentos sub-celulares a iguales tiempos que los descritos y observados en la condición control (Figura 9-A y 9-B). Por otra parte, como se muestra en la Figura 9, al someter a las levaduras al mismo tratamiento con los análogos estructurales de Sortin2 se visualizan alteraciones evidentes en la cinética de internalización del marcador, pues el tiempo al cual se observa el trazador en la membrana vacuolar es mucho menor que el necesario en las condiciones Control y de Sortin2, evidenciando claras diferencias funcionales entre éste y los análogos estructurales, resaltando la especificidad del mecanismo de acción de Sortin2.

A pesar de las diferencias y similitudes en los efectos observados en la cinética de internalización del marcador FM4-64 bajo los tratamientos con los distintos análogos estructurales, ninguno de éstos presenta el mismo patrón de bioactividad en las levaduras silvestres y en las mutantes. Esto da un indicio acerca de la especificidad de interacción entre el biomodulador Sortin2 y su(s) posible(s) blanco(s) molecular(es).



**Figura 9. Efecto de los análogos estructurales de Sortin2 en la endocitosis del marcador FM4-64 en la cepa *Asl1* de *S. cerevisiae*.** En **A**, levaduras en tratamiento control con 1% DMSO, en **B** levaduras tratadas con Sortin2 20  $\mu\text{M}$ , en **C** levaduras tratadas con el análogo 1 40  $\mu\text{M}$ , en **D** levaduras tratadas con el análogo 2 80  $\mu\text{M}$ , en **E** levaduras incubadas con análogo 3 20  $\mu\text{M}$ , y en **F** levaduras tratadas con análogo 4 40  $\mu\text{M}$ . Todas fueron incubadas 72 horas antes de ser evaluadas. Según lo observado en las figuras C, D, E y F, los análogos estructurales de Sortin2 alteran la cinética de endocitosis, no así Sortin2 (B), en cuyo tratamiento no se observan diferencias respecto del control. Las flechas azules indican la asociación del trazador a la membrana en tiempo cero, las flechas verdes señalan la localización endosomal del trazador, mientras que las flechas amarillas señalan al trazador asociado a la membrana vacuolar. Barra 5  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2. Búsqueda de genes ortólogos a *clc1* y *sla1* de *S. cerevisiae* en *A. thaliana* y genotipificación de mutantes insercionales**

En el punto anterior se destacó la posible participación de, al menos, dos productos génicos en el efecto de Sortin2, cuya función asignada está directamente relacionada con los procesos de formación de vesículas de clatrina en levaduras, estructuras que resultan fundamentales para el tráfico vesicular, ya sea en la ruta secretoria o en la endocitosis. A raíz de esto y de la alta conservación evolutiva que tienen muchas de las proteínas involucradas en estos procesos, se decidió establecer un paralelismo entre lo observado en *S. cerevisiae* y otro organismo modelo ampliamente utilizado en la investigación biológica como *A. thaliana*, pues esto nos permitiría extrapolar los fenómenos que se observan en las levaduras, al plano vegetal y así encontrar posibles conexiones con otros procesos biológicos que sean alterados por Sortin2.

##### **4.2.1. Búsqueda de genes ortólogos a *clc1* y *sla1* de *S. cerevisiae* en *A. thaliana***

Para establecer posibles nexos de la acción del compuesto químico en ambos organismos, lo primero que se realizó fue una búsqueda de proteínas ortólogas a las codificadas por los genes de interés en las bases de datos disponibles en Internet, de esta manera los nombres de cada gen fueron introducidos en el programa YOGY (eukaryotic orthology) que permite de manera integrada buscar proteínas ortólogas en diez organismos eucariontes y un procarionte de forma simultánea utilizando cinco bases de datos independientes. La búsqueda se realizó para los genes *clc1* (YGR167W) y *sla1* (YBL007C) de *S. cerevisiae* y no arrojó resultados positivos para ninguno de los dos genes, al menos en *A. thaliana*,

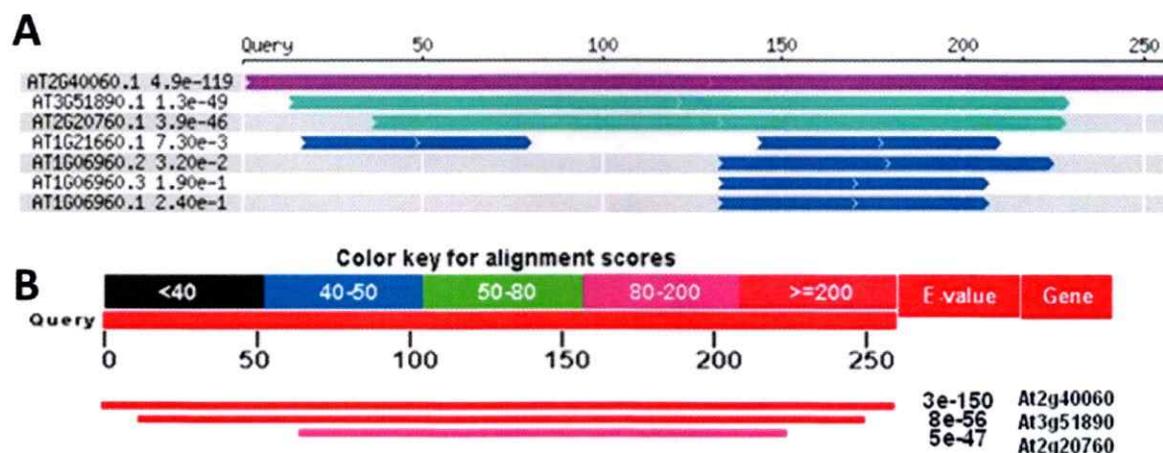
puesto que si existen ortólogos de estos genes en otros organismos como por ejemplo, *Homo sapiens*.

Como alternativa a esto, se utilizó como herramienta el alineamiento básico local de las secuencias aminoacídicas de las proteínas asociadas a cada gen (BLAST-P); contra dos bases de datos de proteínas de *A. thaliana* independientemente, el “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y “The Arabidopsis Information Resource” (TAIR). Sin embargo, en ninguna de ellas se obtuvieron resultados satisfactorios, puesto que las regiones que presentaban cierto grado de homología no se correlacionaban en su GO y presentaban funciones o etiquetas que distaban de las funciones moleculares asignadas a dichas proteínas en *S. cerevisiae*, por lo que aquellas relaciones no fueron consideradas.

Finalmente, se utilizó como criterio principal, la referencia bibliográfica. Así, lo descrito por Urte Sheele y Susanne E.H. Holstein, en 2002; se transformó en la principal evidencia de la existencia de al menos tres posibles ortólogos a *clc1* en *A. thaliana*. En dicho trabajo, mediante un análisis bioquímico y funcional, Sheele y Holstein identificaron tres fragmentos que compartían características funcionales con la proteína CLC1 de *S. cerevisiae*. Sin embargo, sólo se pudo asociar uno de ellos a un gen específico de *A. thaliana*, At2g40060. Mientras que los otros dos fragmentos no fueron asociados a ningún gen en particular.

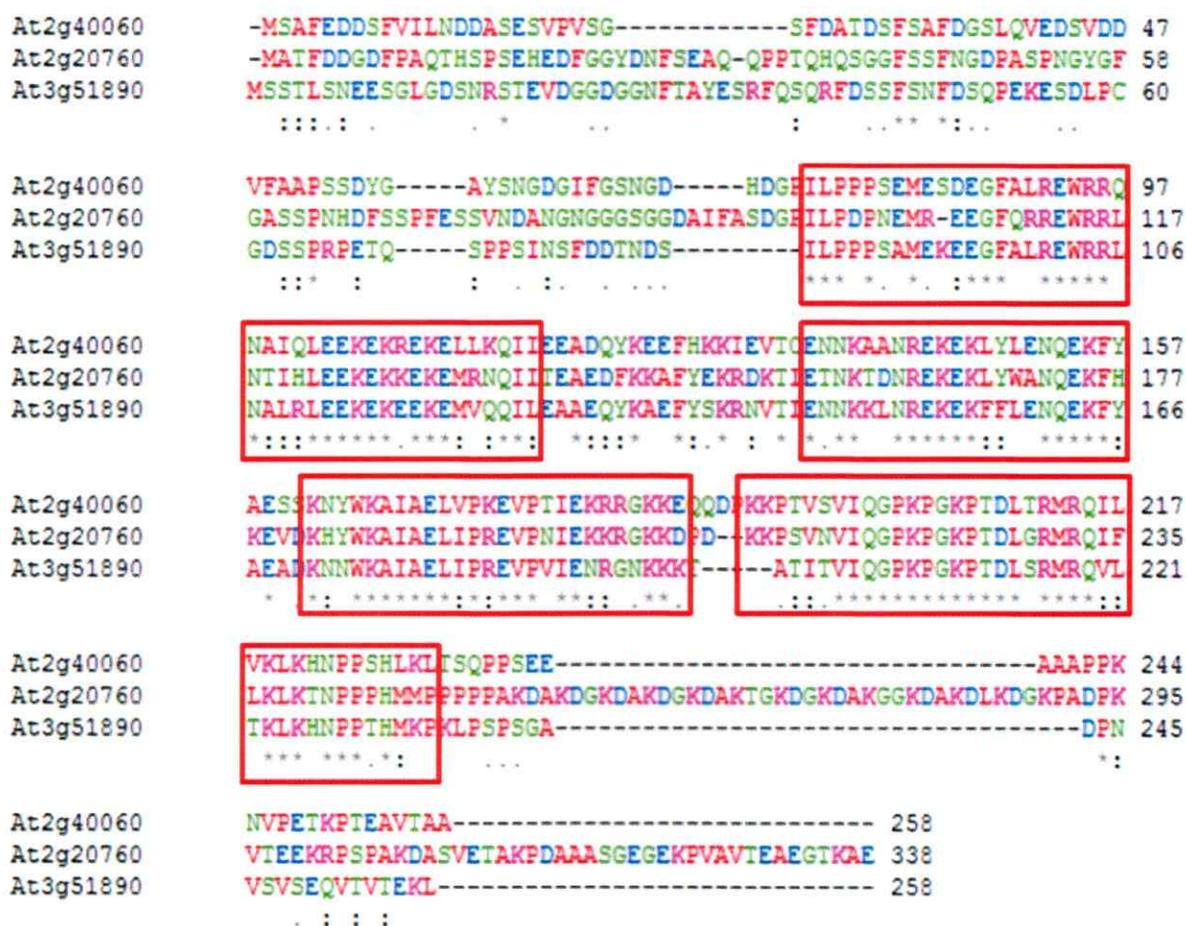
Con esta información se decidió buscar proteínas homólogas mediante un nuevo BLAST-P en la base de datos TAIR y en NCBI, utilizando la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por el gen At2g40060 como motivo de búsqueda. De esta forma, en la base de datos TAIR se encontraron como primeros aciertos los genes At3g51890, con un 44% de identidad aminoacídica y un 51% de similitud en sus 258 aminoácidos; y At2g20760 con

un 40% de identidad y un 47% de similitud. Ambos aparecen descritos en TAIR con la anotación de genes codificantes de la proteína de cadena liviana de clatrina. Consistentemente, la base de datos NCBI, arroja resultados similares para el gen At3g51890 con un 50% de identidad y un 61% de similitud en los 258 aminoácidos; y para At2g20760 con un 40% de identidad y 47% de similitud con la proteína codificada por At2g40060 (Figura 10). Como alternativa a estos resultados obtenidos por BLAST-P, se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas codificadas por los distintos genes, utilizando la herramienta CLUSTAL-W2 disponible en la red, que permite el alineamiento múltiple de secuencias. En este análisis se observa un alto grado de conservación en dominios particulares de las secuencias, lo que sugiere fuertemente la homología funcional de los tres productos génicos (Figura 11). Frente a esta información se consideró a estos tres genes como posibles ortólogos de *clc1* de *S. cerevisiae* en *A. thaliana* para efectos posteriores.



**Figura 10.** Búsqueda de homólogos al gen de *A. thaliana* At2g40060 mediante BLAST-P. La figura A, muestra los resultados del alineamiento realizado en la base de datos TAIR, observándose un alto grado de similitud entre los productos génicos de At3g51890, At2g20760 y el gen blanco At2g40060. Se identificaron las secuencias codificadas por otros genes cuya descripción o etiqueta de GO no concordaban con lo buscado, por lo que quedaron fuera de análisis. En B, se observa la misma búsqueda realizada esta vez en la base de datos de NCBI, el análisis arroja sólo las secuencias codificadas por los genes At3g51890 y At2g20760 utilizando la secuencia codificada por el gen At2g40060 como motivo de búsqueda.

Respecto del producto génico del gen *sla1*, cuya ausencia también determina la resistencia a los efectos de Sotin2 en *S. cerevisiae*. El análisis bioinformático, al igual que en el caso de *clc1*, no arrojó resultados positivos. Tampoco se encontraron referencias bibliográficas que permitieran identificar posibles ortólogos funcionales o estructurales a la proteína SLA1 en *A. thaliana*, por lo que el siguientes objetivo propuesto para este seminario de título, sólo considera los ortólogos descritos para *clc1*.



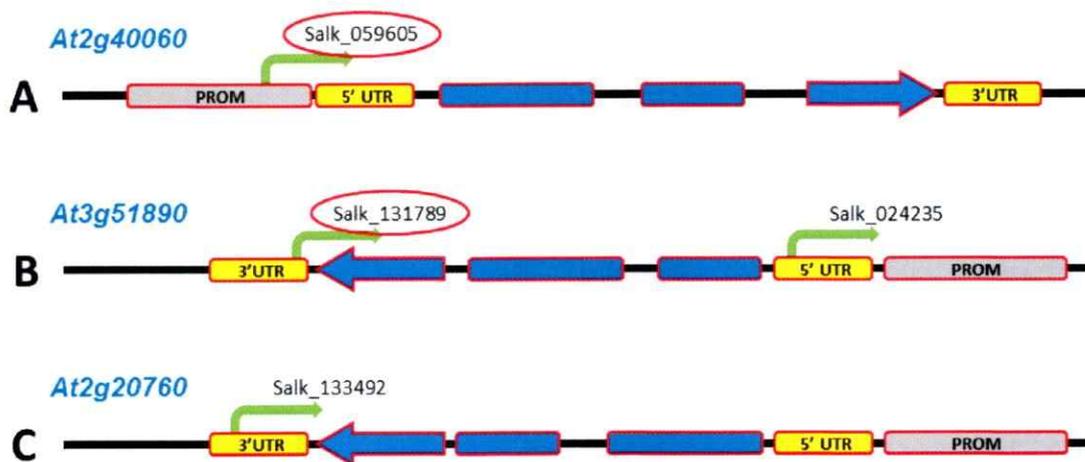
**Figura 11. Alineamiento de secuencias aminoacídicas codificadas por los genes At2g40060, At3g51890 y At2g40060.** Alineamiento múltiple realizado utilizando la herramienta CLUSTALW2. Se observan regiones con alto grado de homología (cuadros rojos), correspondientes principalmente a los dominios de unión a CHC. Se observan en verde los aminoácidos que presentan grupos hidroxilo, grupos amino y grupos básicos; en azul aquellos de carácter netamente ácido; en rojo los aminoácidos pequeños e hidrofóbicos, incluyendo los aromáticos y en rosado aquellos de características básicas. Por otra parte los asteriscos (\*) representan la conservación del residuo en las tres secuencias presentadas, dos puntos (:) hace referencia a la conservación parcial del residuo y de sus características y un punto (.) implica la presencia de un residuo con propiedades fisicoquímicas similares, semi-conservado.

#### **4.2.2. Selección de líneas mutantes de *A. thaliana* en los genes At2g40060 y At3g51890 y diseño de la estrategia molecular para su genotipificación**

Una vez encontrados los genes ortólogos que codifican para la CLC1 en *A. thaliana* se realizó una búsqueda de mutantes, en cada uno de los ortólogos para visualizar los efectos de Sortin2 en la planta y postularlos como posibles blancos moleculares de este biomodulador. Por esto, se buscaron mutantes insercionales en el banco de semillas SALK (<http://signal.salk.edu/>), el cual posee una gran colección de líneas mutantes de *A. thaliana* que han sido transfectadas con *Agrobacterium tumefaciens*, de manera tal que el elemento insercional proveniente de dicho organismo, T-DNA, se inserta aleatoriamente en alguna región del genoma de la planta. De esta manera, se buscaron y encargaron semillas a dicho banco de semillas, que tuvieran una inserción de T-DNA en cada uno de los tres genes ortólogos a CLC1, obteniendo así, una línea mutante insercional para el gen At2g40060 (Salk\_059605), dos líneas para el gen At3g51890 (Salk\_131789 y Salk\_024235) y una línea mutante para el gen At2g20760 (Salk\_133492) (Figura 12).

Se ordenaron las semillas correspondientes y una vez disponibles en nuestro laboratorio, se inició el trabajo con dos de las cuatro líneas encargadas. Se eligieron en el comienzo sólo dos líneas mutantes en dos de los genes de interés por razones de tiempo y de practicidad en el manejo de las líneas de plantas y de los correspondientes análisis. Sin embargo, con el transcurso del tiempo se definieron sólo estas líneas como objeto de estudio, por lo que los análisis posteriores, sólo fueron realizados en las líneas Salk\_059605 que presenta inserción en el gen At2g40060 y Salk\_131789 que posee inserción en el gen At3g51890 según la información del banco de mutantes.

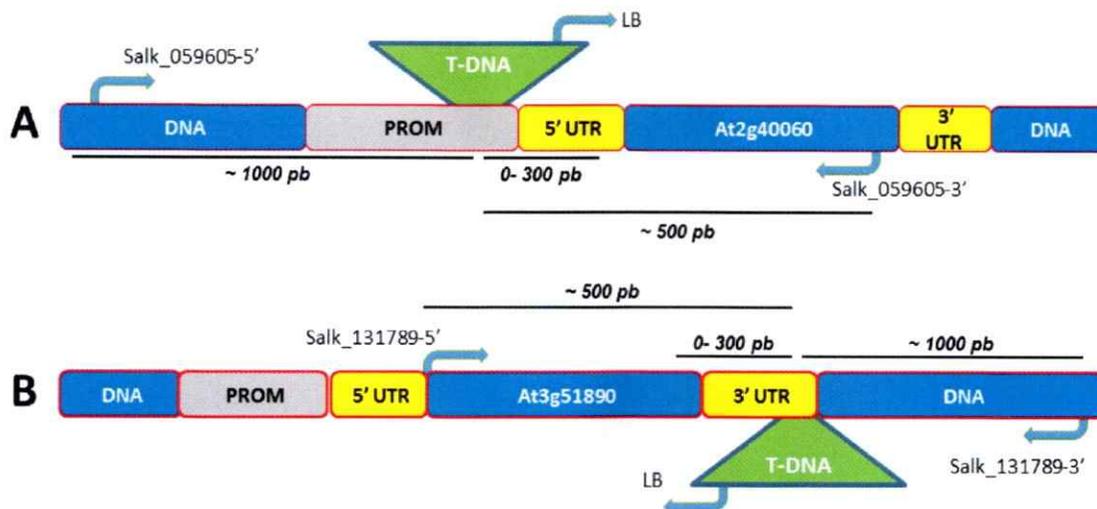
La información que genera el banco de mutantes SALK es de libre acceso en el sitio TAIR (<http://www.arabidopsis.org>), cuya plataforma permite visualizar distintas regiones del genoma de *Arabidopsis*, indicando zonas adyacentes a las distintas inserciones. Así, el sitio TAIR señala que la inserción de T-DNA en la línea Salk\_059605 se encuentra en la región promotora del gen At2g40060, mientras que en la línea Salk\_131789, la inserción se encontraría presente en la región 3' UTR del gen At3g51890 (Figura 12). A pesar de la información con que se cuenta, es preciso, una vez recibidas las semillas, confirmar la presencia de la inserción y si ésta se encuentra en el lugar del genoma que afirma el banco de mutantes y el sitio TAIR.



**Figura 12. Líneas mutantes insertionales en homocigosis disponibles en el banco de semillas SALK.** En **A**, línea mutante insertional confirmada para el gen At2g40060 (Salk\_059605), ubicada alrededor de 300 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. En **B**, se representan dos líneas mutantes disponibles para el gen At3g51890, la Salk\_131789 ubicada, según la base de datos TAIR, a 50 pares de bases del sitio del codón de término de la transcripción aproximadamente y la línea Salk\_024235 localizada alrededor de 50 pares de bases río arriba del sitio del inicio de la transcripción. En **C**, línea mutante Salk\_133492, para el gen At2g20760, cuya inserción se describe aproximadamente 150 pares de base río abajo del sitio de término de la transcripción. Se destacan en rojo las líneas utilizadas en este trabajo de tesis, los bloques azules representan los exones de cada gen y la punta de flecha señala la orientación del marco de lectura, en amarillo se señalan las regiones no traducidas ubicadas en 5' y 3', en gris se representa la región promotora de la transcripción, mientras que en verde se señala la dirección en que se produjo el inserto de T-DNA que interrumpe el marco de lectura, según lo establecido por el banco de semillas.

Dado que el objetivo planteado es identificar líneas mutantes que presenten el inserto de T-DNA en homocigosis, se diseñaron partidores específicos que flanquean la zona donde se encuentra el inserto (Figura 13). El sitio TAIR, entrega una región que ha sido secuenciada a partir del Borde Izquierdo del inserto (Left Border, LB), no obstante dada la técnica de secuenciación utilizada puede existir un fragmento de hasta 300 pares de bases que no haya sido considerado, por lo que es preciso tenerlo presente para establecer el tamaño del fragmento a amplificar. Con estas consideraciones, para el gen At2g40060 se diseñó el partidor Salk\_059605-5' que hibrida aproximadamente a 1000 pares de bases (pb) río arriba del sitio de inserción y el partidor Salk\_059605-3' que hibrida aproximadamente 500 pb río abajo del sitio de inserción descrito en la base datos. Ambos oligonucleótidos fueron evaluados utilizando un BLAST-N en el sitio NCBI presentando sólo un sitio de hibridación, con un apareamiento del 100% correspondiente al gen At2g40060 amplificando un fragmento de 1520 pb (Figura 13-A).

Para el gen At3g51890, según la base de datos, la inserción de T-DNA se encuentra en antisentido, respecto del marco de lectura del gen, por lo que se generaron los partidores Salk\_131789-5', que hibrida aproximadamente 490 pb río arriba de la inserción y el partidor Salk\_131789-3' que hibrida aproximadamente 980 pb río abajo del sitio de inserción de T-DNA. Al igual que los anteriores, su especificidad fue evaluada mediante BLAST-N en la base de datos del sitio NCBI, existiendo sólo un sitio de unión para cada uno y con una identidad del 100% en el gen correspondiente. La distancia a cual se encuentran estos partidores es 1470 pb. Cabe señalar que en este caso en particular el LB, del T-DNA de la inserción, se encuentra hacia el extremo 5' del gen en cuestión, por lo que los análisis se realizan utilizando un partidor que hibrida en LB y aquel que hibrida río arriba de la inserción (Figura 13-B).



**Figura 13. Diseño de partidores específicos para el análisis de homocigosis insercional.** Para las líneas seleccionadas para analizar la homocigosis del inserto de T-DNA, se diseñaron partidores que flanquearan la región en la cual se encontraría el inserto. De esta manera en **A**, se esquematiza la localización de los partidores utilizados para el análisis de la línea mutante Salk\_059605, que presenta inserción en la región promotora del gen At2g40060, uno de éstos hibrida aproximadamente 1000 pares de bases río arriba del sitio de inserción, mientras el otro aproximadamente 600 pares de bases río abajo del sitio de inserción, además se presenta el sitio de hibridación del partidor LB en el T-DNA. En **B**, se representa la localización de los sitios de hibridación de los partidores utilizados para analizar la línea Salk\_131789, localizados alrededor de 500 pares de bases río arriba y 1000 pares de bases río abajo del sitio de inserción localizado en la región 3' UTR del gen At3g51890 y del LB del T-DNA. En ambos análisis existe un posible desfase entre la ubicación real de la inserción y el sitio descrito por la base de datos TAIR de alrededor de 300 pares de bases. Ambos esquemas presentan orientación 5'→3'.

#### 4.2.3. Genotipificación de las mutantes con inserciones de T-DNA, Salk\_059605 y Salk\_131789, mediante técnicas de PCR

Una vez diseñados y adquiridos los partidores, se comenzó a hacer el análisis para genotipificarlas mediante PCR. Para ello se utilizaron semillas obtenidas y recolectadas por Pablo Riveros, quien recibió las líneas mutantes encargadas al banco de semillas SALK, las sembró en medio hidropónico y finalmente recolectó las semillas de cada planta, previamente rotulada e identificada como portadora de la inserción. Las diferentes líneas obtenidas debieron ser reconfirmadas y de ellas se seleccionaron plantas que portaban la inserción en homocigosis. Las semillas fueron sembradas en placas Petri con medio MS durante tres semanas, al cabo de éstas, se recolectó tejido de hojas de la roseta para extraer

el DNA genómico. Las placas fueron puestas a 4°C para disminuir la tasa metabólica y de crecimiento de las plantas mientras se iban traspasando a medio hidropónico para realizar los análisis.

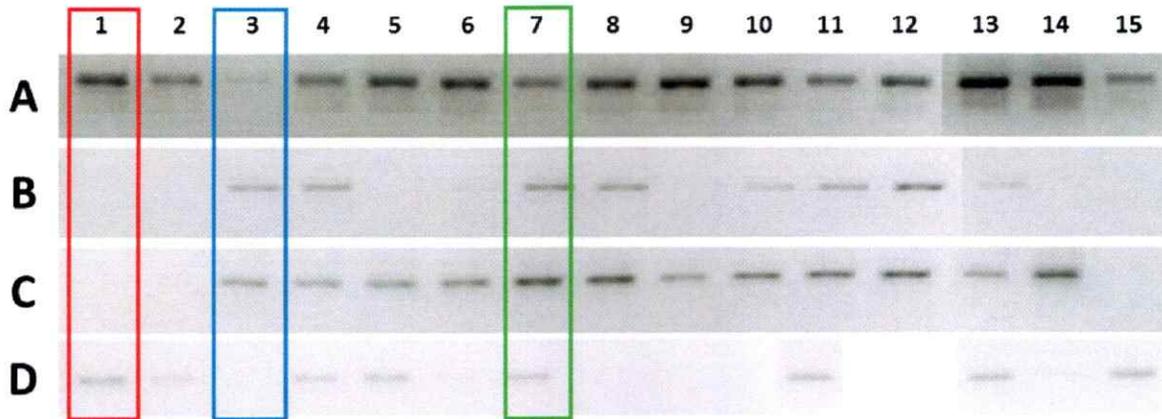
El DNA genómico del tejido recolectado de cada planta fue obtenido mediante extracciones por solvente, utilizando el método CTAB descrito en materiales y métodos. A este DNA se le hizo una evaluación de calidad, amplificando un gen de expresión constitutiva, en este caso se utilizó el gen que codifica la proteína Actina. Luego, se corroboró la presencia de inserción en el genoma utilizando partidores que amplifiquen el gen NPTII que otorga resistencia a las plantas al antibiótico kanamicina; este gen es parte del T-DNA que se inserta en el genoma de la planta. Una vez hecho este análisis, se verificó que la inserción estuviera en el lugar que indica la base de datos TAIR y el banco de semillas SALK, para lo cual se utilizó un partidador que hibrida a la región LB del T-DNA y otro que hibrida en el DNA genómico de la planta (detalle de partidores en Tabla 3). De esta manera, si existe amplificado, la inserción se ubica en el lugar descrito por la base de datos; de no existir un amplificado la inserción de T-DNA puede haberse localizado en cualquier otra región del genoma de la planta, lo que nos aleja de nuestro objetivo final. Por último, una vez corroborada la localización de la inserción en el gen de interés, se verificó la condición homocigota de la inserción del T-DNA, esto mediante la realización de un PCR utilizando los partidores que hibridan flanqueando la región de inserción, pues dada su extensión, la polimerasa no es capaz de amplificar un fragmento tan extenso y no será posible visualizarlo.

En la Figura 14 se observa un ejemplo de los productos de PCR obtenidos al realizar todos estos análisis y la identificación de líneas mutantes que poseen inserción en homocigosis

(Carril 3, Cuadro Azul), heterocigosis (Carril 7, Cuadro Verde). Se incluye también un ejemplo de una planta que no posee inserción (Carril 1, Cuadro Rojo). Este análisis se realizó en 61 plantas de la línea mutante Salk\_059605 obteniéndose sólo 8 líneas homocigotas. Mientras que en línea Salk\_131789 se realizó para 68 plantas obteniéndose 37 líneas homocigotas. En la Tabla 2 se muestra en mayor detalle la cantidad de semillas sembradas, analizadas y las líneas obtenidas. Las plantas por su parte, luego de ser puestas a 4°C por un par de semanas, fueron trasplantadas a un medio de cultivo hidropónico, para luego dejarlas crecer hasta recolectar sus semillas y almacenarlas para ser utilizadas en análisis posteriores. De esta manera para el objetivo propuesto, se identificaron distintas líneas de *A. thaliana* que presentan mutaciones insercionales en homocigosis en genes At2g40060 y At3g51890, ortólogos a *clc1* de *S. cerevisiae*.

Línea Mutante	Gen de inserción	Plantas sembradas	Plantas Analizadas	Líneas HM	Líneas HT	Líneas SI	Líneas ND
Salk_131789	At3g51890	80	68	37	5	8	18
Salk_059605	At2g40060	80	61	10	14	33	4

**Tabla 2.** Resumen de plantas de *A. thaliana* analizadas durante la genotipificación. Líneas mutantes insercionales fueron sembradas y luego genotipificadas para comprobar la inserción del T-DNA en homocigosis.



**Figura 14. Análisis de homocigosis en líneas mutantes insercionales de *A. thaliana*.** Imágenes de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para determinar la homocigosis insercional de la progenie de *A. thaliana* provenientes de la parental T3 de la línea mutante Salk\_059605. En **A**, amplificación del gen de Actina, en **B** amplificación del gen NPTII presente en el T-DNA. En **C**, amplificación utilizando partidores que hibridan en el LB del inserto de T-DNA y río abajo de éste en el DNA genómico. En **D**, amplificación utilizando partidores que hibridan en DNA genómico, flanqueando la región donde se encuentra la inserción, para evidenciar homocigosis. Se destacan líneas sin inserción en rojo (Carril 1), línea homocigota y heterocigota para la inserción, en azul y verde respectivamente (Carril 3 y 7).

#### **4.3. Caracterización de los procesos endocíticos en mutantes insercionales de *A. thaliana* de los genes ortólogos a *clc1*, At2g40060 y At3g51890, mediante la internalización de un trazador fluorescente**

Una vez determinadas las líneas de *A. thaliana* que poseen la inserción de T-DNA en homocigosis, es preciso evaluar si esto se traduce en una disminución efectiva de los niveles de transcrito de los genes interrumpidos y además si eso se condice con alguna alteración en los mecanismos de endocitosis, que concitan nuestro interés. Para esto se realizó un RT-PCR semicuantitativo con partidores específicos para cada ortólogo a *clc1* de *S. cerevisiae* y posteriormente se evaluó la internalización del marcador fluorescente FM4-64 en líneas mutantes insercionales homocigotas en los genes At2g40060 (T3-10) y At3g51890 (T1-14). Esto con el objetivo de correlacionar posibles alteraciones en los

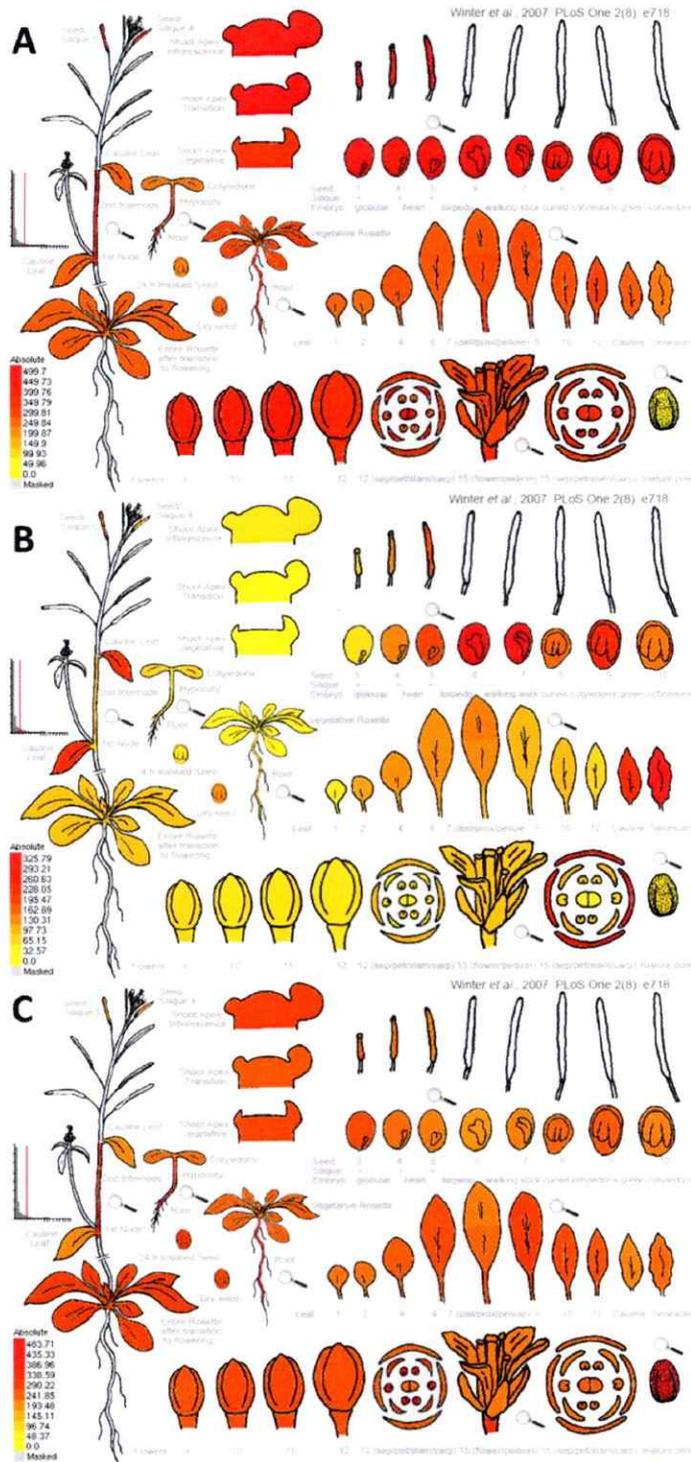
niveles de expresión de los genes estudiados, con defectos en los procesos de endocitosis a nivel celular. De esta manera podremos establecer si el efecto de Sortin2 en *A. thaliana* tiene alguna relación con los niveles de transcrito de alguno de los ortólogos de *clc1* de *S. cerevisiae* y por ende con la disminución de sus productos génicos asociados, homologando los resultados obtenidos en el análisis de levaduras.

#### **4.3.1. Análisis bioinformático de los patrones de expresión de genes parálogos a *clc1* y extracción de RNA de plantas de *A. thaliana***

Una vez determinada la homocigosis de la inserción en las distintas líneas mutantes de *A. thaliana* se procedió a verificar si dicha interrupción de los genes o las secuencias regulatorias asociadas a éstos, se correlacionaba con una disminución en la cantidad de mRNA proveniente de la expresión de dichos genes. Para el cumplimiento de este objetivo es preciso manejar alguna información previa, como por ejemplo si la expresión de los distintos genes es diferencial o ubicua. Para esto se revisaron los datos que arroja la página de la Universidad de Toronto y su plataforma eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), donde se recopilan datos acerca de la expresión de los genes de *Arabidopsis* en distintas condiciones de crecimiento o etapas de desarrollo, estos datos son principalmente obtenidos mediante Affymetrix, empresa que se caracteriza en el desarrollo de Microarrays. La búsqueda se desarrolló para los tres genes de interés en *A. thaliana*.

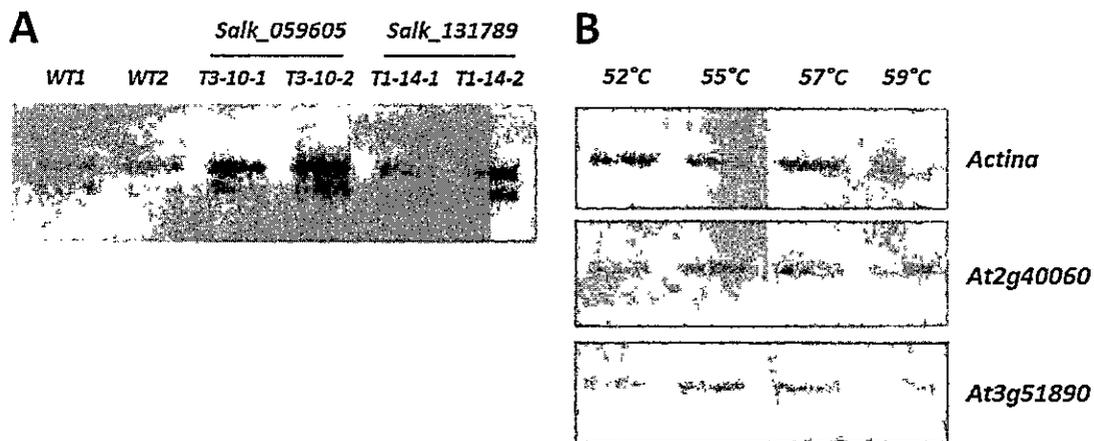
Para el gen At2g40060 los datos la plataforma muestra una expresión en niveles medios-altos según los parámetros de la base de datos, en forma ubicua y en los distintos estadios de desarrollo, lo mismo ocurre cuando se visualiza la expresión del gen At2g20760, pues se observa una expresión moderada en todos los tejidos y estadios de desarrollo. Sin embargo, se observa una diferencia llamativa respecto del gen anterior y es que, en polen, se expresa

en altos niveles sólo el gen At2g20760, mientras que el gen At2g40060, muestra una muy baja expresión en dicha estructura. Por su parte el análisis del gen At3g51890, muestra muy bajos niveles de expresión en muchos tejidos, excepto en algunos estadíos del desarrollo de la semilla y de las hojas. En estas últimas su expresión aumenta cuando se acercan a la senescencia. En la Figura 15 se muestran datos obtenidos, en los que se grafica la expresión absoluta de cada gen en los distintos genes y estadíos, permitiéndonos visualizar de mejor manera la expresión diferencial que tienen estos parálogos para CLC1 en *A. thaliana*.



**Figura 15.** Expresión absoluta de genes At2g40060, At3g51890 y At2g20760, según eFP browser. Representación de los niveles de expresión absoluta, según el sitio eFP browser. En A se representa la expresión del gen At2g40060, en distintos órganos y estadios de desarrollo de *A. thaliana*, la escala de color se observa en la esquina inferior izquierda. En B se observa la expresión del gen At3g51890 y en C, la expresión del en At2g20760. En base a esto se decidió considerar la planta completa a los 21 días de crecimiento para los análisis posteriores.

En base a estos datos, se decidió evaluar la cantidad de mRNA en plantas completas de 21 días, puesto que en plántulas de menor tiempo la expresión del gen At3g51890, según eFP Browser, era demasiado baja. Por lo tanto, a plantas completas de 21 días de desarrollo, se les extrajo el RNA mediante un kit comercial. Se midieron algunos parámetros para determinar la calidad del RNA extraído mediante espectrofotometría, como la razón de las absorbancias utilizando longitud de ondas de 260/280 nm y 230/280 nm, utilizando el Nanodrop® del Laboratorio de Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, determinándose niveles aceptables de contaminación por compuestos fenólicos, de DNA u otras macromoléculas que interfieren en la disponibilidad del mRNA al momento de realizar un RT-PCR. Adicionalmente para comprobar la integridad del RNA se analizaron, mediante electroforesis en un gel de Agarosa, las distintas subunidades de RNA observándose dos bandas claramente definidas correspondientes a las sub-unidades ribosomales, 18S y 23S que representan mayoritariamente al RNA extraído (Figura 16-A). Comprobados estos parámetros, se realizó un RT-PCR. El cDNA resultante de la reacción de RT-PCR fue evaluado utilizando partidores para amplificar un gen de expresión constitutiva como Actina, resultando todos útiles para los análisis posteriores (Figura 16-B, panel superior).



**Figura 16. Integridad de RNA y especificidad de partidores.** Electroforesis en geles de agarosa. En A se corrieron alícuotas del RNA extraído a plantas silvestres (carril 1 y 2), a plantas con inserciones de T-DNA en homocigosis en el gen *At2g40060* (carril 3 y 4) y a plantas con inserciones de T-DNA en homocigosis en el gen *At3g51890* (carril 5 y 6), en todos se distingue claramente dos bandas correspondientes a las subunidades 18S y 23S, lo que indica un alto grado de integridad del RNA extraído. En B se observan las bandas obtenidas al amplificar los genes de *Actina*, *At2g40060* y *At3g51890* en el cDNA de plantas silvestres, lo que nos indica la especificidad de los partidores diseñados para amplificar los genes señalados.

#### 4.3.2. Diseño de partidores y estandarización de protocolo de PCR semi-cuantitativo

Luego, de comprobar la calidad del RNA y del cDNA obtenido a partir de él, se procedió a diseñar partidores específicos para amplificar las secuencias codificantes provenientes de los distintos genes. Para ello se consideró que cada par de partidores permitiera amplificar, la mayor parte de la región del mRNA que será traducida. Los partidores fueron diseñados utilizando criterios básicos como el porcentaje de GC de la secuencia y la localización terminal de algunas de estas mismas bases, para darle mayor estabilidad al momento de la hibridación. Luego, los posibles partidores fueron evaluados utilizando el programa Primer3 Plus disponible en Internet (<http://primer3plus.com/>), que entrega mayor información como la temperatura de hibridación, las posibles estructuras secundarias que se formen en la secuencia o el porcentaje de hibridación de cada partidore consigo mismo o con

su par. De esta manera, se diseñaron los partidores cAT2g40060-Ex-F, de secuencia que hibrida en la región 5'UTR del mRNA del gen At2g40060 y su par cAT2g40060-Ex-R, que hibrida en los últimos nucleótidos de la región codificante. Para el gen At3g51890 se diseñaron los partidores cAt3g51890-Ex-F, que hibrida en la secuencia 5'UTR del transcrito y el cAt3g51890-Ex-R que hibrida río arriba a partir del último nucleótido. Finalmente, se diseñó también el partidador cAt2g20760-Ex-F que hibrida en la parte terminal del 5'UTR y en los primeros nucleótidos de la región codificante y su par cAt2g20760-Ex-R que al igual que en el caso anterior hibrida río arriba desde el último nucleótido.

Para cada partidador se realizó un BLAST-N contra el genoma de *A. thaliana* menos las regiones intrónicas, encontrándose sólo una región de hibridación con identidad del 100% para cada uno en particular. Los partidores utilizados para amplificar Actina desde el cDNA se encontraban con anterioridad en el Laboratorio (Tabla 3).



Nombre	Secuencia (codones)	BP	Gen target
LbB1.3	ATT TTG CCG ATT TCG GAA C	19	left border, Salk mutants
AtActin4AA89 5'	CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT	20	Actina de <i>Arabidopsis</i>
AtActin4AA320 3'	GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT	20	Actina de <i>Arabidopsis</i>
SALK_059605-5'	GGC ATG TGG TGC AAT GAT AA	20	At2g40060
SALK_059605-3'	GCA AAT CCC TCA TCT GAT TCC	21	At2g40060
SALK_131789-5'	ATC AAT CAA ACA GGC GAA GG	20	At3g51890
SALK_131789-3'	AAC CGC GAG AAA GAG AAG GT	20	At3g51890
At3g51890Ex-Clo-R	CGA CAA CTT CTC TGT AAC TGT GAC CTG	27	At3g51890
At3g51890Ex-Clo-F	GTG GAC ACA AAG CAG AGC AA	20	At3g51890
At2g20760Ex-Clo-R	TGA CTC CGC CTT GGT TC	17	At2g20760
At2g20760Ex-Clo-F	CAT GGC GAC TTT TGA TGA TGG	21	At2g20760
At2g40060Clo-R	TGA AGC AGC AGT AAC TGC CTC	21	At2g40060
At2g40060Ex-Clo-F	GAT TCG CGA GTT CTT CGT TC	20	At2g40060
At2g40060Ex-R	TAA CTG CCT CAG TGG GCT TG	20	At2g40060

**Tabla 3. Partidores utilizados para análisis.** Detalle de las secuencias utilizadas para realizar los análisis de PCR y sq-PCR en *A. thaliana*.

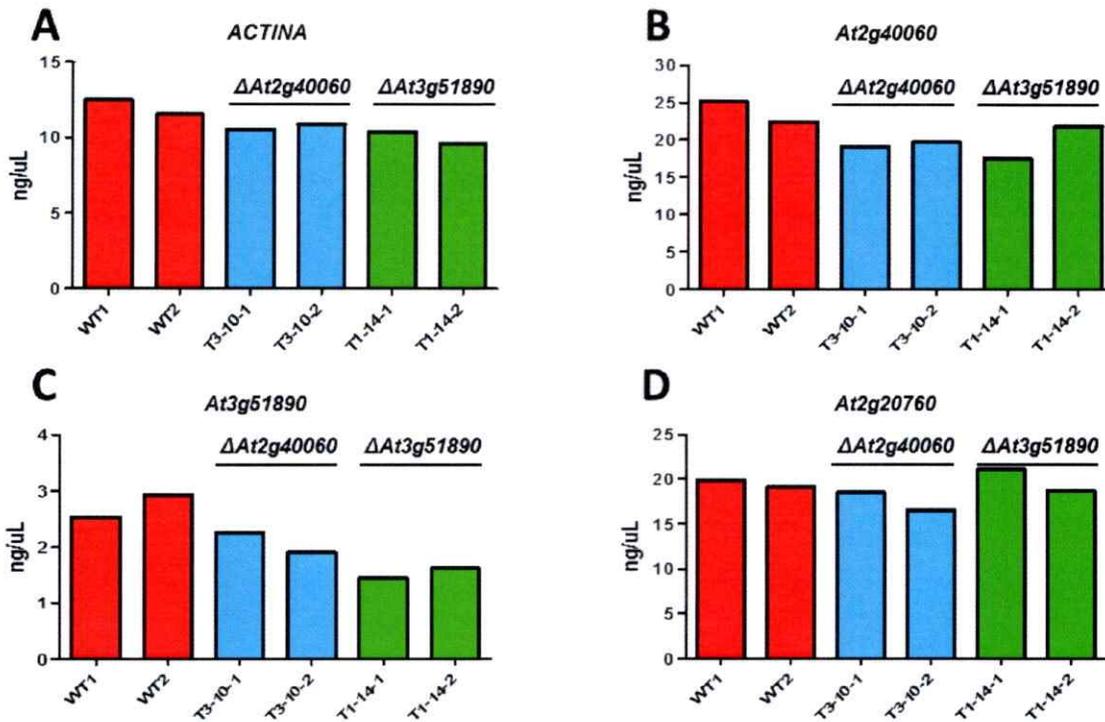
Una vez obtenidos los partidores, el cDNA y la información necesaria acerca de la expresión de cada gen se comenzó a realizar la estandarización de los protocolos de RT-PCR semicuantitativo. Para ello lo que primero se determinó fue la especificidad de los partidores al momento de amplificar cada transcrito mediante un gradiente de temperatura, observándose para cada par de partidores sólo una banda en las distintas temperaturas. Luego se determinó la cantidad de ciclos necesarios para observar un producto de PCR cuantificable, puesto que si se genera demasiado amplificado, al revelar el gel se pierde la relación entre intensidad de banda y cantidad de amplificado. Esto se realizó en una

muestra de RNA proveniente de una planta silvestre de 21 días como se explicó anteriormente, amplificando de los transcritos de Actina, At2g40060 y At3g51890 (Fig. 16-B).

#### **4.3.3. Semi-cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de los ortólogos a *clc1* en líneas mutantes insercionales homocigotas en los genes At2g40060 y At3g51890**

La cuantificación de los niveles de expresión de los distintos genes se realizó mediante densitometría utilizando el programa ImageJ, como se describe en materiales y métodos. Las mediciones fueron realizadas en tres replicas técnicas y cada una de ellas se incluía la respectiva replica biológica. Los resultados obtenidos de estas mediciones muestran diferencias esperables en cuanto a la expresión absoluta de cada uno de los genes en las distintas líneas, destacando niveles similares en la expresión de los genes At2g40060 y At2g20760, mientras que el gen At3g51890 presenta niveles de expresión muy inferiores (Figura 17), tal como se podía inferir a partir del análisis bioinformático realizado anteriormente (Figura 15).

Las líneas de *A. thaliana* que presentan inserción de T-DNA en homocigosis en los genes At2g40060 y At3g51890, no presentan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresiones de los respectivos genes interrumpidos al compararlas con las otras líneas mutantes y con una planta silvestre, lo que sugiere que la transcripción del gen que presenta el inserto continúa siendo funcional y permitiría muy probablemente la traducción de la proteína correspondiente.



**Figura 17. Niveles de expresión de genes ortólogos a *clc* en *A. thaliana*.** Evaluación por sq-PCR en líneas con inserción de T-DNA en homocigosis. Los partidores diseñados amplifican el cDNA de cada uno de los genes para visualizar posibles mecanismos de compensación. En **A** se observan los niveles de un gen de expresión constitutiva como actina. En **B**, se grafican los niveles de transcripto del gen *At2g40060*, no observándose diferencias significativas en las líneas mutantes insercionales. En **C** y en **D**, se muestran los niveles de transcripto para los genes *At3g51890* y *At2g20760*, respectivamente, no observándose diferencias significativas entre las distintas líneas. Por lo anterior se infiere que no hay un efecto evidente en los niveles de expresión aun cuando exista la inserción de T-DNA. En rojo se grafican los resultados obtenidos en líneas silvestres. En celeste, lo obtenido en línea mutante *Salk\_059605*, con inserción en el gen *At2g40060* y en verde la línea *Salk\_131789*, con inserción en el gen *At3g51890*.

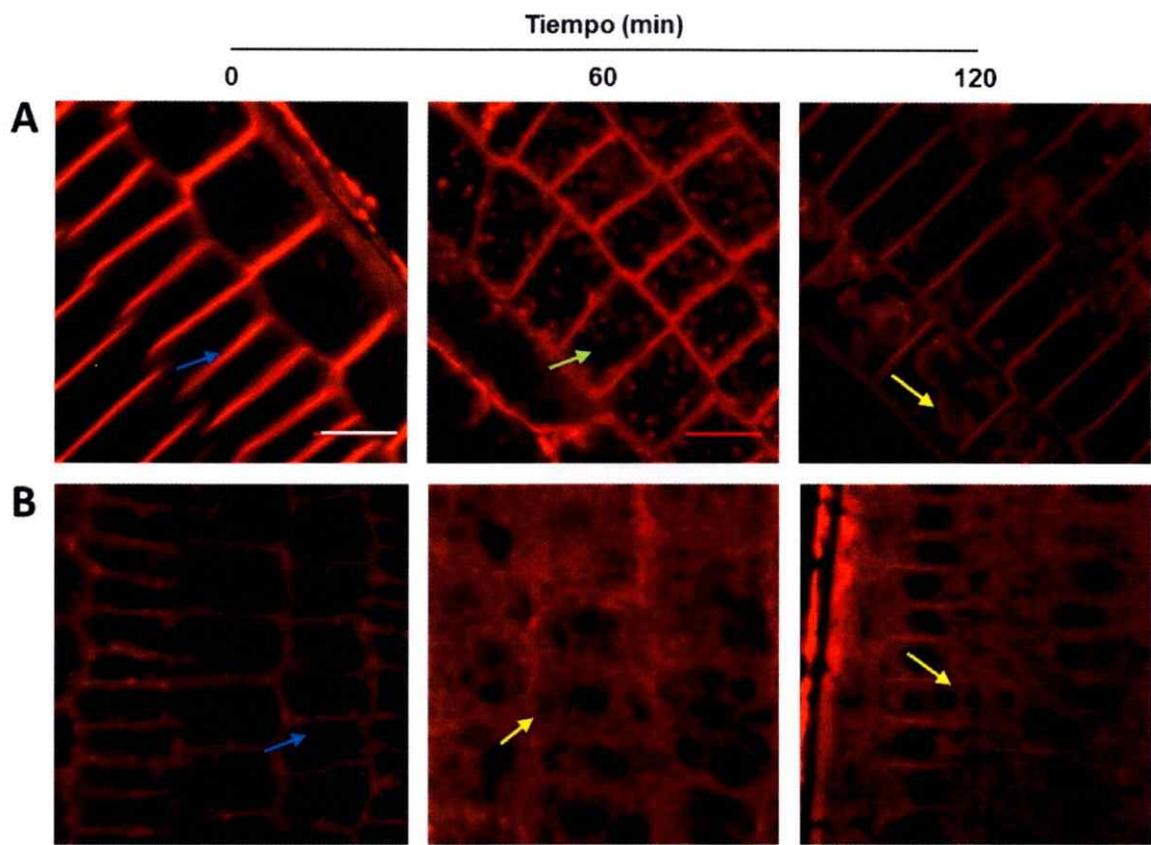
Esto se observa en la Figura 17, donde se grafica expresión absoluta de cada uno de los genes analizados. En la Figura 17-A se representan los niveles de actina, los cuales no presentan mayor variación entre las distintas líneas evaluadas. En la figura 17-B se observa la expresión correspondiente al gen *At2g40060* para las tres plantas analizadas ( $\Delta At2g40060$ ,  $\Delta At3g51890$  y una planta silvestre) junto con sus respectivas réplicas biológicas. En la Figura 17-C, para las mismas muestras, se cuantifican los niveles de transcripto del gen *At3g51890*. Mientras que en la Figura 17-D se presenta la cuantificación de los mRNA transcritos a partir del gen *At2g20760*, esta última medición se realizó

esperando posibles mecanismos de compensación debido a la interrupción de los genes anteriormente mencionados, sin embargo, tampoco se observan diferencias significativas en las plantas mutantes insercionales respecto de una planta silvestre.

De esta manera, se infiere de los resultados obtenidos, que no se detecta una disminución en los niveles de transcrito de los genes At2g40060 y At3g51890 en líneas mutantes insercionales en homocigosis de cada uno de estos genes. Además, que los niveles de transcrito del gen At2g20760 no se ven alterados en éstas líneas, descartando posibles mecanismos de compensación en la transcripción de los ortólogos a *clc1* de *S. cerevisiae* en *A. thaliana*.

#### **4.3.4. Evaluación de la cinética de endocitosis en líneas mutantes insercionales homocigotas en los genes At2g40060 y At3g51890 de *A. thaliana***

Una vez determinados los niveles de los transcritos de los genes At2g40060 y At3g51890 se evaluó los efectos de Sortin2 de las plantas mutantes insercionales homocigotas. Para ello, y utilizando resultados anteriores del Laboratorio obtenidos por Patricio Pérez (Pérez, 2012; Pérez-Henríquez et al, 2012), se realizó el seguimiento del marcador FM4-64, que al igual que en las levaduras, sigue la ruta endocítica desde la membrana plasmática hacia endosomas, PVC y finalmente la vacuola, sin existir evidencia de reciclaje (Figura 18).



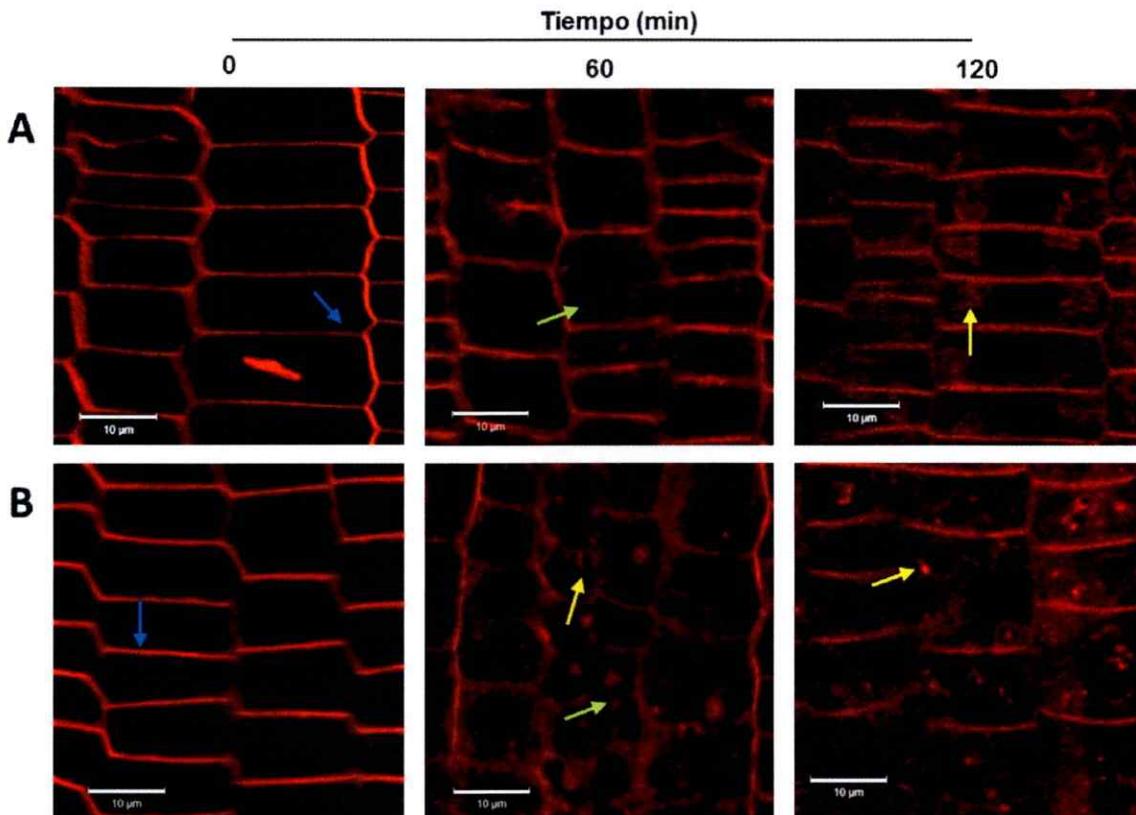
**Figura 18. Endocitosis de trazador FM4-64 en *A. thaliana*.** En **A**, tratamiento control con 1% DMSO y en **B** plantas tratadas con Sortin2 116  $\mu$ M. En **A** se observa que el trazador FM4-64 se ubica a tiempo cero en la pared celular (flecha azul) y en endosomas luego de 60 minutos de iniciado el seguimiento (flecha verde), finalmente a un tiempo de 120 min alcanza la membrana vacuolar (flechas amarillas). En **B** se observa que el trazador alcanza la membrana vacuolar a un tiempo de 60 min, por lo que se observa una aceleración de la endocitosis del trazador. Barra 10  $\mu$ m (modificado de Pérez-Henríquez et al, 2012)

La referencia del patrón de fluorescencia utilizada como control muestra que luego de incubar la planta con FM4-64 el marcador queda unido a la membrana plasmática. Luego de 60 minutos se observan estructuras punteadas que corresponderían a endosomas. Al cabo de 120 minutos de comenzada la incubación se observan estructuras circulares de mayor tamaño que corresponden a vacuolas. En tratamientos con Sortin2 50  $\mu$ g/mL (116 $\mu$ M) se observa, 60 minutos después de la incubación, la presencia del marcador en diferentes regiones intracelulares, no distinguiéndose claramente estructuras como

endosomas o vacuola (Pérez, 2012; Pérez-Henríquez et al, 2012). Dado este fenotipo se realizó el mismo ensayo en las líneas que presentaban inserciones en homocigosis para determinar si al interrumpir alguno de los genes que codifican para CLC en *A. thaliana* se observa una resistencia al compuesto químico como en *S. cerevisiae*.

En la Figura 19 se muestra el seguimiento del marcador fluorescente FM4-64 en la línea de *A. thaliana* que posee inserción en homocigosis en el gen At2g40060. Se observa luego del tratamiento con el trazador y la incubación a 4°C la localización del marcador en el perímetro de la célula, lo que correspondería a la membrana plasmática y/o pared celular. 60 minutos después de iniciado el seguimiento, se observan estructuras punteadas correspondientes a endosomas, al igual que lo observado en la línea silvestre. Finalmente, 120 minutos después de la primera observación se visualizan estructuras circulares en el intracelular, lo que indica la localización del marcador en el tonoplasto o membrana vacuolar.

Al realizar el tratamiento con Sortin2 a ésta misma línea se observa a tiempo cero la localización periférica del marcador. No obstante, a los 60 minutos, ya es posible visualizar el trazador localizado en el tonoplasto, estructura que en condiciones control alcanza a los 120 minutos. Si comparamos este fenómeno con lo observado en la cepa silvestre en tratamientos controles y con Sortin2 podemos identificar dos diferencias importantes. La primera es que el proceso de endocitosis del trazador ocurre con mayor velocidad respecto del tratamiento control, lo que sugiere que no hay resistencia al efecto del biomodulador. Sin embargo, la segunda diferencia es que el fenotipo observado en el tratamiento con Sortin2 es menos dramático que el que se visualiza en la cepa silvestre.



**Figura 19. Endocitosis de trazador FM4-64 en línea mutante Salk\_059605.** En **A**, *A. thaliana* con inserción en el gen At2g40060 en tratamiento control con 1% DMSO y en **B** plantas tratadas con Sortin2 116  $\mu\text{M}$ . En **A** se observa la misma cinética de endocitosis del trazador FM4-64 que en plantas silvestres, pues alcanza la membrana vacuolar (flechas amarillas) a un tiempo de 120 min. En **B** se observa que el trazador alcanza la membrana vacuolar luego de 60 minutos de iniciado el seguimiento. Con flecha azul se señala el trazador localizado en la pared celular y con flecha verde se indica al trazador ubicado en compartimentos subcelulares que corresponderían a endosomas. Barra 10  $\mu\text{m}$

En la línea que presenta inserción en el gen At3g51890 se observa prácticamente el mismo fenotipo que en la línea mutante insercional anterior, destacándose una aceleración en la internalización del marcador en condiciones de tratamiento con Sortin2 respecto de la condición control, mas no un efecto tan severo como el que se observa en la línea silvestre (Figura 20).



efecto del biomodulador; no obstante, las líneas mutantes insercionales homocigotas presentan un fenotipo menos severo que el observado en la planta silvestre. Esto último podría evidenciar alguna resistencia parcial al efecto del biomodulador o de menor escala que lo observado en *S. cerevisiae*.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterizar los procesos endocíticos en cepas de *S. cerevisiae*, que presentan resistencia a Sortin2, mediante la internalización de un trazador fluorescente y el uso de análogos estructurales

Resultados previos de la Dra. Norambuena sobre resistencia a Sortin2 en cepas mutantes haploides de *S. cerevisiae*, utilizando un análisis de secreción de la proteína vacuolar CPY, permitió observar una relación de dosis-dependencia entre la cantidad de Sortin2 y la secreción de CPY. En este contexto, sería interesante estudiar la internalización del marcador fluorescente FM4-64 a concentraciones menores de Sortin2, de manera de confirmar que dicha relación se mantiene en el análisis de cinética de internalización, permitiéndonos evaluar a su vez, si la resistencia se mantiene a concentraciones mayores o a que niveles de tratamiento el biomodulador resulta tóxico para la célula.

La endocitosis mediante vesículas de clatrina, es uno de los mecanismos por el cual se produce la internalización de algunos sustratos hacia el medio intracelular, , estas mismas vesículas son también las que transportan la proteína CPY hacia la vacuola. De esta forma, al no alterarse la cinética de internalización del marcador FM4-64, se infiere que no hay internalización y con ello efecto del biomodulador. Sin embargo, es posible que exista internalización a través de otros mecanismos o que Sortin2 afecte a su vez otros mecanismos de endocitosis. Para ello se trató de analizar la internalización del marcador “amarillo lucifer” cuyas propiedades le permiten ingresar al espacio intracelular y luego a la vacuola a través de endocitosis de fase fluida, un tipo de transporte pasivo que no requiere gasto energético. Sin embargo, no fue posible replicar lo descrito en la literatura en el laboratorio, por lo que se descartó su estudio. De esta forma resultaría interesante, para

determinar la especificidad del efecto de Sortin2 sobre los mecanismos de endocitosis alterados, evaluar la funcionalidad de otros mecanismos de internalización de sustratos en presencia de Sortin2.

La realización de tratamientos con análogos estructurales de Sortin2, buscaba evidenciar la especificidad de acción del biomodulador Sortin2 y con ello la existencia de uno o más blancos moleculares que gatillaran el efecto observado. En este sentido, se observó que distintos grupos funcionales son necesarios para que el biomodulador tenga algún efecto sobre la internalización del marcador fluorescente, no obstante es necesario realizar nuevos ensayos, estandarizando la concentración de tratamiento, puesto que en los realizados durante el presente trabajo fueron determinados arbitrariamente, a partir de los ensayos de secreción de CPY realizados anteriormente y en función de los resultados que se esperaban, lo que hizo más compleja la interpretación de los mismos. Además para determinar la existencia de uno o más blancos moleculares específicos para Sortin2 es necesario realizar otro tipo de ensayos que no fueron considerados para este trabajo, como por ejemplo el docking, que nos permitiría evaluar, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del biomodulador y del blanco molecular hipotético, cuales son las posibilidades de interacción que existiría entre ambos.

## **5.2. Búsqueda de genes ortólogos a *clc1* y *sla1* de *S. cerevisiae* en *A. thaliana* y genotipificación de mutantes insercionales**

Si bien existe referencia bibliográfica que describe experimentalmente al gen At2g40060 como el que codifica para la cadena liviana de clatrina en *A. thaliana* y los análisis

bioinformáticos coinciden en que los parálogos encontrados, At3g51890 y At2g20760, tienen regiones altamente conservadas, las cuales corresponde a los dominios de unión a CHC, sería interesante realizar ensayos de complementación en *S. cerevisiae* con las secuencias de mRNA de los genes correspondientes, de manera de verificar, en primera instancia, la ortología funcional de los genes de *Arabidopsis* y además, verificar si existe reversión del fenotipo resistente a Sortin2, lo que nos permitiría postular con mayor fuerza a *clc1* como uno de los blancos moleculares de Sortin2.

Llama la atención que los genes de *A. thaliana* estando descritos, o al menos etiquetados, como codificantes para CLC1, no aparezcan en la búsqueda bioinformática como ortólogos de la secuencia, nucleotídica o aminoacídica, del gen correspondiente de *S. cerevisiae* pues, de no ser por la referencia bibliográfica probablemente no hubiésemos obtenidos resultados positivos utilizando sólo este tipo de herramientas. Quizás eso haya ocurrido en el caso de la proteína accesoria SLA1 que, por lo descrito en la literatura, cumpliría un papel relevante en el proceso de formación de la vesícula de clatrina, postulándose también su participación en el proceso de escisión de la misma.

Sobre las líneas utilizadas y los resultados obtenidos es preciso decir que la ambición inicial, nos hizo querer analizar las 4 líneas que se encontraron en la base de datos SALK, por lo que no hubo mayor análisis al momento de elegir las dos líneas iniciales. Por lo anterior, se eligió la variante Salk\_131789, que posee la inserción en la región 3'UTR y no la variante, Salk\_024235, que posee la inserción en la región 5'UTR del gen At3g51890, lo que *a priori* parece más lógico, considerando que la inserción en la región 3'UTR, permitiría la transcripción completa del gen.

Respecto de la cantidad mutantes homocigotas, también nos llamó la atención, el muy bajo número de plantas que contenían la inserción del T-DNA en homocigosis en el gen At2g40060, considerando que el banco de semillas las vende como tal.

### **5.3. Caracterizar los procesos endocíticos en mutantes insercionales de *A. thaliana* para los genes ortólogos a *clc1* y *sla1*, mediante la internalización de un marcador fluorescente**

Considerando resultados anteriores del grupo de Laboratorio de la Dra. Norambuena, particularmente de Patricio Pérez (Pérez Patricio, 2012; Pérez-Henríquez et al, 2012), se observó que Sortin2 producía el mismo efecto que se visualizaba en levaduras, es decir, la aceleración de la cinética de internalización del marcador fluorescente FM4-64, asociado a una evidente desorganización celular. Con este antecedente, se realizó el estudio de la endocitosis del marcador fluorescente en las líneas homocigotas identificadas.

Los resultados muestran una cinética normal en condiciones control, la cual se ve acelerada en condiciones de tratamiento, lo que nos indica que la planta no es resistente a la acción del biomodulador, sin embargo se observa una diferencia notoria en cuanto a la severidad del efecto que se describe en una línea silvestre de *A. thaliana*, lo que nos sugiere la posibilidad de que exista algún grado de resistencia o de algún mecanismo compensatorio debido a la multiplicidad génica observada en la planta. Una manera de ir verificando esta resistencia, asociada a la falta del blanco molecular del biomodulador, sería generar una planta doble o triple mutante para los genes ortólogos a *clc1*, sin embargo, también existe el riesgo de la inviabilidad.

Otro análisis que se debe realizar a futuro es la complementación de las levaduras mutantes, con los respectivos ortólogos de *clc1*, para verificar la reversión del fenotipo propio de la mutante, así como también la pérdida de la resistencia al efecto del biomodulador, lo que nos daría aún mayores indicios para postular a *clc1* como un posible blanco molecular de Sortin2.

Durante el crecimiento de las plantas, tanto para los análisis de PCR, como para los tratamientos con Sortin2 y la visualización de su efecto mediante microscopía confocal, se observaron algunas diferencias en cuanto al crecimiento, longitud de la raíz principal y cantidad de raíces laterales, sin embargo, estas características no fueron cuantificadas, por lo que sería interesante evaluar si la interrupción de algunos de éstos genes afecta el desarrollo normal de la planta, considerando que lo visualizado en los análisis de expresión muestra que cada parálogo se expresa en forma diferencial en algunos estadios de desarrollo de la planta.

Finalmente, los análisis realizados por sqRT-PCR que no arrojan resultados estadísticamente significativos, no permiten confirmar que aquellas plantas que presentan la inserción en homocigosis no transcriben el gen correspondiente, por lo que para corroborar la disminución efectiva de los niveles de transcrito es necesario realizar PCR en tiempo real, el que además nos permitiría evaluar los niveles de transcrito de los otros genes parálogos para verificar si existe algún mecanismo de compensación. A su vez, sería importante realizar un Western Blot, para cuantificar los niveles de proteína presentes en aquellas mutantes insercionales, pues aun cuando se determinen niveles “normales” de transcrito, existe la posibilidad de que ese transcrito no llegue a traducirse en una proteína

funcional, lo que explicaría en parte, esta resistencia parcial al efecto y la no disminución de los niveles de transcrito cuantificados por el sqRT-PCR.

## 6. CONCLUSIONES

El tratamiento de las cepas silvestres de *S. cerevisiae* con Sortin2 (20  $\mu$ M) junto con gatillar la secreción de la proteína CPY, permite observar una aceleración en la cinética de internalización del marcador FM4-64, destacando su localización vacuolar a menores tiempos que lo observado en condiciones control.

Las cepas de *S. cerevisiae* que presentaban resistencia total o parcial a los efectos Sortin2 en ensayos de secreción de la proteína vacuolar CPY, no ven alterada su cinética de internalización en tratamientos con Sortin2 respecto de la condición control. No obstante, es importante señalar que éstas cepas mutantes *per se*, tienen una cinética de internalización diferente a lo observado en la cepa silvestre, lo que se condice con lo descrito en la literatura. De esta forma lo observado en presencia del biomodulador es similar a lo que ocurre en ausencia de CLC1, lo que sugiere que esta proteína podría ser un posible blanco molecular de Sortin2

La cinética de internalización del marcador fluorescente FM4-64 en tratamientos con análogos estructurales de Sortin2, y sus efectos en la secreción de la proteína CPY, no guarda relación con lo observado en tratamientos con Sortin2, por lo que se infiere la especificidad de acción y de interacción con sus posibles blancos moleculares.

El efecto de Sortin2 en levaduras también se observa en *A. thaliana*, lo que sugiere que el biomodulador afecta los mismos mecanismos en ambos organismos. Líneas mutantes homocigotas de *A. thaliana* en genes ortólogos a *clc1* presentan resistencia parcial o nula al biomodulador, lo cual se explica por la zona de inserción del T-DNA en las líneas escogidas para el análisis, pues no afectaría necesariamente la transcripción de una proteína

funcional. No obstante, en la línea con mayor probabilidad de pérdida de transcripción se observa similitud con el fenotipo esperado, lo que indicaría una correlación con lo observado en las cepas mutantes de levaduras.

## 7. REFERENCIAS

- **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008.** Molecular Biology of the Cell. Ch. 10, 12 & 13. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 5° Edición.
- **Alexander Fotin, Yifan Cheng, Piotr Sliz, Nikolaus Grigorieff, Stephen C. Harrison, Tomas Kirchhausen & Thomas Walz, 2004.** Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. Nature, Vol. 432, 573-579.
- **Brian J Galletta and John A Cooper, 2009.** Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. Current Opinion in Cell Biology, 21:20–27
- **Catherine A. Konopka, Steven K. Backues and Sebastian Y. Bednareka, 2008.** Dynamics of *Arabidopsis* Dynamin-Related Protein 1C and a Clathrin Light Chain at the Plasma Membrane. The Plant Cell, Vol. 20, 1363–1380.
- **Campbell W. Gourlay, Hilary Dewar, Derek T. Warren, Rosaria Costa, Nilima Satish and Kathryn R. Ayscough, 2003.** An interaction between Sla1p and Sla2p plays a role in regulating actin dynamics and endocytosis in budding yeast. Journal of Cell Science 116, 2551-2564.
- **Conibear E., Stevens Tom H., 1998.** Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. Biochimica et Biophysica Acta 1404, 211-230.
- **Corinne J. Smith, Nikolaus Grigorieff and Barbara M.F. Pearse, 1998.** Clathrin coats at 21 Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. The EMBO Journal Vol.17 No.17,4943–4953,

- **Cynthia K. Damer and Theresa J. O'Halloran, 2000.** Spatially Regulated Recruitment of Clathrin to the Plasma Membrane during Capping and Cell Translocation. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 11, 2151–2159.
- **Derek T. Warren, Paul D. Andrews, Campbell W. Gourlay and Kathryn R. Ayscough, 2002.** Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *Journal of Cell Science* 115, 1703-1715
- **Diana S. Chu, Babak Pishvaei, and Gregory S. Payne, 1996.** The Light Chain Subunit Is Required for Clathrin Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, No. 51, 33123–33130,
- **Foresti, O. & Denecke, J. 2008.** Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic*. 9: 1599 – 1612
- **Jan Zouhar, Glenn Hicks, Natasha Raikhel, 2004.** Sorting inhibitors (sortins): chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *PNAS*. Vol 101, No 25, 9497 – 9501
- **John R. Collette, Richard J. Chi, Douglas R. Boettner, Isabel M. Fernandez-Golbano, Rachael Plemel, Alex J. Merz, Maria Isabel Geli, Linton M. Traub and Sandra K. Lemmon, 2009.** Clathrin Functions in the Absence of the Terminal Domain Binding Site for Adaptor-associated Clathrin-Box Motifs. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 20, 3401–3413.
- **Juan S. Bonifacino and Jennifer Lippincott-Schwartz, 2003.** Coat proteins: shaping membrane transport. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, Vol. 4, 409-414.
- **Kenneth R. Henry, Kathleen D'Hond, JiSuk Chang, Thomas Newpher, Kristen Huang, R. Tod Hudson, Howard Riezman and Sandra K. Lemmon, 2002.** Scd5p and Clathrin Function Are Important for Cortical Actin Organization, Endocytosis, and Localization of Sla2p in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 13, 2607–2625.

- **Kiminori Toyooka, Yumi Goto, Satoru Asatsuma, Masato Koizumi, Toshiaki Mitsui and Ken Matsuoka, 2009.** A Mobile Secretory Vesicle Cluster Involved in Mass Transport from the Golgi to the Plant Cell Exterior. *The Plant Cell*, Vol. 21, 1212–1229.
- **Kristen M. Huang, Lisa Gullberg, Karen K. Nelson, Christopher J. Stefan, Kendall Blumer and Sandra K. Lemmon, 1996.** Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *Journal of Cell Science* 110, 899-910.
- **Lars Hinrichsen, Anika Meyerholz, Stephanie Groos, and Ernst J. Ungewickell, 2006.** Bending a membrane: How clathrin affects budding. *PNAS*, Vol. 103, No. 23, 8715–8720.
- **Lorena Norambuena, Jan Zouhar, Glenn R Hicks and Natasha V. Raikhel, 2008.** Identification of cellular pathways affected by Sortin2, a synthetic compound that affects protein targeting to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Chemical Biology*, 8:1.
- **Neberführ, A. 2002.** Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, RABs and SNAREs. *Curr. Op. in Pl. Biol.* 5: 507 – 512
- **Niloufer G Irani and Eugenia Russinova, 2009.** Receptor endocytosis and signaling in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol 12, 653–659.
- **Pérez Patricio, 2012.** Caracterización celular y molecular de los efectos de Sortin2 en *A. thaliana* Cotutor: Dr. Michael Handford. (Agosto 2009- Marzo 2011). Aprobada marzo 2012

- **Pérez-Henríquez, P, Raikhel, NV and Norambuena L, 2012.** Endocytic trafficking towards the vacuole plays a key role in the auxin receptor SCFTIR-independent mechanism of lateral root formation in *A. thaliana*. *Molecular Plant*. 5 (6): 1195-1209
- **Thomas M. Newpher, Fatima-Zahra Idrissi, Maria Isabel Geli and Sandra K. Lemmon, 2006.** Novel Function of Clathrin Light Chain in Promoting Endocytic Vesicle Formation. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 17, 4343–4352.
- **Thomas Vida and Scott Emr, 1995.** A New Vital Stain for Visualizing Vacuolar Membrane Dynamics and Endocytosis in Yeast, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 128, No. 5, 779-792
- **Tom Kirchhausen, 2009.** Imaging endocytic clathrin structures in living cells. *Trends Cell Biol.* 2009 Nov; 19(11): 596–605.
- **Urte Scheele, Susanne E.H. Holstein, 2002.** Functional evidence for the identification of an *Arabidopsis* clathrin light chain polypeptide. *FEBS Letters* 514, 355-360.
- **Viviane Poupon, Martine Girard, Valerie Legendre-Guillemin, Sebastien Thomas, Lyne Bourbonniere, Jacynthe Philie, Nicholas A. Bright and Peter S. McPherson, 2008.** Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly. *PNAS*, Vol. 105, No. 1, 168–173