

UCH-FC  
Biotecnología  
Q 896  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Caracterización de mutantes insercionales en  
genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos de DFG10  
de *Saccharomyces cerevisiae*”**



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

**CARLOS FELIPE RUBILAR HERNÁNDEZ**

Directora de Seminario de Título: **Dr. Lorena Norambuena**

Co-director de Seminario de Título: **Dr. Michael Handford**

Diciembre 2010

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. Carlos Rubilar Hernández

### **“Caracterización de mutantes insercionales en genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos de DFG10 de *Saccharomyces cerevisiae*”**

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**

Dra. Ana Preller

**Presidenta de la Comisión**

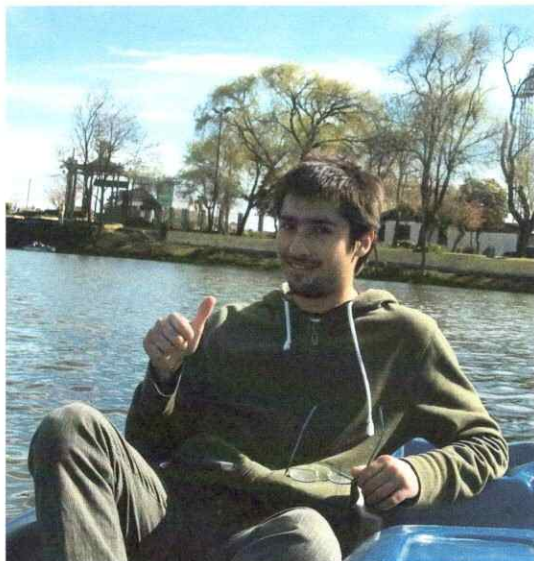
Dr. Alejandro Roth

**Evaluador**



Santiago de Chile, 16 de Diciembre del 2010.

## Biografía



Mi vida comenzó un día martes 25 de Noviembre de 1986 a las 2:15 a.m en el hospital de Carabineros en la comuna de Ñuñoa. Soy hijo de Viviana Hernández y Juan Carlos Rubilar, quienes con sus ejemplos de vida, empeño, consejos, profundo amor y cariño me han dado los valores con los cuales me muevo y me moveré en la vida. Dos años después nació mi hermano Rodrigo (Higo) y sinceramente no sé cómo habría sido mi vida sin él. Mi hermano y yo nos criamos juntos en la antigua casa de La Florida donde tuvimos una infancia muy buena, llena de juegos, rasmillones y amigos, aunque al principio no haya sido así debido a la enfermedad. Mis primos, primas que han sido verdaderas hermanas y tías han estado presentes desde mi tierna infancia hasta el día de hoy.

Mi educación básica la pasé en el Colegio mixto "Victoria", una escuela muy pequeña, pero que me dio muchos buenos recuerdos y de donde obtuve una muy buena formación la cual me ha servido hasta el día de hoy. De esos años me hubiera gustado mantener el contacto con varias personas, pero por circunstancias de la vida no fue posible. Después llegó a mi vida el Instituto Nacional "José Miguel Carrera", inmenso colegio en varios sentidos donde aprendí muchísimas cosas. Aquí hice mis amigos de la vida, con los cuales con algunas sorpresas que se dieron posteriormente, aun siguen acompañándome hasta el día de hoy y veo que el lazo que hemos formado es fuerte y duradero. El preuniversitario fue una grata experiencia donde hice un puñado de amigos, sin embargo no logró disipar mis dudas de qué estudiar. Con esta inquietud di la PSU y pude quedar en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Al ver ahora el pasado, puedo decir que tomé la decisión correcta. Aquí conocí el verdadero rigor del estudio, las ojeras, los verdaderos carretes, el baile, el coro y descubrir la pasión por la ciencia. No obstante, no puedo desligarme de los amigos que tengo ahora y que realicé en el transcurso de la carrera, ya que tuve el privilegio de estar rodeado de una calidad humana que creo que pocos pueden decir. Ahora comenzamos a dar nuestros primeros pasos en el mundo de la ciencia y aunque nuestros caminos comiencen a divergir, tengo la convicción que en el futuro nos seguiremos juntando para reírnos de la vida y a darnos apoyo en los malos momentos.

Sin embargo, no sería nadie sin la gran influencia de Rengo y Los Ángeles, lugares donde se encontraban mis abuelos y familia de mi madre y de mi padre, respectivamente. El calor hogareño, los chalecos, las fotos en el Salto del Laja y el viento helado de Los Ángeles como el sol de verano, el olor a campo, el estero, los cerros, los perros Choco y Pirata, los árboles y las frutas y hortalizas de Rengo, de una forma inexplicable han quedado conmigo en mi vida citadina. También no sería el que soy hoy sin ellos. La familia que me acogió y que sin dar nada a cambio me abrieron las puertas de su casa. Como me dijo la tía Ani una vez, fue un verdadero milagro y lo creo. Me refiero a la familia de Isabel Bugueño y Edmundo González, donde conocí el verdadero crecimiento personal y el verdadero amor. Sin ustedes no sabría en qué pasos andaría y aunque el destino nos ha alejado un poco quiero expresar a ustedes cuatro mi eterna gratitud.

Por último, pero no por eso menos importante, está el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal. Aquí he conocido un gran grupo humano y científico del cual me siento muy, pero muy agradecido. Me acuerdo de cómo era en la primera conversación con mi tutora, la Dra. Lorena Norambuena y definitivamente soy otra persona, científicamente hablando. Ella me ha sabido guiar y me ha enseñado mucho de lo que es y es hacer ciencia.

Ahora, con 24 años, viviendo en una nueva casa en Puente Alto junto a mi familia puedo decir que poseo y confío en mis capacidades para desenvolverme en el futuro. Con optimismo, camino en este verdadero sendero de sorpresas llamado vida.





## Agradecimientos

Primero que todo, quiero agradecer profundamente a mis papás Viviana y Juan Carlos y mi hermano Rodrigo quienes me han apoyado de muchas formas distintas a lo largo de estos años de formación universitaria y también en el transcurso de la realización de la tesis. En realidad en toda mi vida. Gracias por los abrazos, desayunos hechos con cariño y muchas cosas más que hacen que el día a día se vuelva mejor y que con sus consejos (sí los tres) me han hecho mejor persona. También a mis abuelitos, primos y tíos quienes me han querido como soy.

También quiero agradecerles a mis amigos Alfredo, Felipe, Sebastián y Andrés con quienes ya llevamos ya 10 años de conocernos. Espero que se conserven como son y que esta amistad que nos une viva muchísimos años más.

A mis amigos que hice en la U con quienes compartí miles de horas de estudio, "carretes" y travesías inolvidables: a Jaime, a la Vale (éxito en Francia), Morocco, Marjo, Nico, Toya, Mary, Yorka, Bryan, Sofi, Diego, Dani, Lucho, Chichi, Crema, Beto y Naty García. También a Pablo, Nelly, Nancy y Nallita quienes los conocí en el último año de carrera y con quienes he compartido experiencias y tardes de conversación. Mención especial a Claudia quien con una tacita de café conversamos de la vida y quien aliviaba la carga de la ayudantía.

A ti Pame, aunque la vida nos haya separado, te estoy eternamente agradecido por haberme hecho crecer como persona como nadie lo ha hecho hasta hoy. A ustedes, tía Isa, tío Edmundo y Pauli, por haberme abierto las puertas de su casa y familia y por haber confiado en mí.

A todo el laboratorio de Biología Molecular Vegetal por su increíble energía, especialmente a la Dra. Lorena Norambuena quien me ha guiado por el camino del día a día científico, también a Pato Pérez, Nico Manríquez, Lore Pizarro, Matías Freire y Felipe Espinoza por compartir momentos de ñoñería, conocimientos, dudas, congresos, seminarios, quehacer científico y carretes sin más.

Un agradecimiento especial a Alejandra Pesce quien recientemente ha emigrado al mundo empresarial y con quien compartí varios momentos agradables. Ale, te deseo lo mejor en esta nueva etapa de tu vida. A la Caro Rosas, Pato Miranda, Carlos Salinas, Dani Utz, Fran, Sebastián, Angélica, Romi, Tito y Coke, a todos por hacer del día uno mejor.

Quiero agradecer a los coros "Más América" y el de la Facultad de Ciencias por darme la oportunidad de desarrollar otras facetas de mi persona. También al financiamiento que otorga Fondecyt sin el cual la investigación que he realizado nunca se hubiera podido concretar.



A mi mamá y papá quienes ven aquí el fruto de su esfuerzo.

También para ti hermano, Higo.



## Índice

<b>Listado de Figuras</b>	v
<b>Listado de Tablas</b>	vi
<b>Abreviaturas utilizadas</b>	vii
<b>Resumen</b>	viii
<b>Abstract</b>	x
<b>1.- Introducción</b>	01
1.1.- Sistema de endomembranas	01
1.1.1.- Especificidad y rutas del tráfico vesicular	01
1.1.2.- Esencialidad y limitación del estudio del SE en plantas	04
1.2.- Biomoduladores y genómica química	05
1.3.- <i>Sortins</i> alteran el tráfico endomembranoso en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	06
1.4.- <i>Sortin2</i> y su efecto en un modelo de organismos vegetales	08
1.5.- Búsqueda de los ortólogos de DFG10 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	08
Mutantes insercionales de T-DNA	
<b>2.- Objetivos</b>	11
2.1.- Objetivo general	11
2.2.- Objetivos específicos	11
<b>3.- Materiales y métodos</b>	12
3.1.- Bases de datos y programas bioinformáticos utilizados	12
3.2.- Esterilización y estratificación de semillas	13
3.3.- Cultivo de plantas	13
3.4.- Fotografías, imágenes y análisis del fenotipo morfológico de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
3.4.1.- Análisis fenotípico de líneas insercionales homocigotas	14
3.4.2.- Análisis del proceso endocítico en mutantes insercionales homocigotas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
3.5.- Extracción de DNA genómico	15
3.6.- Partidores utilizados, protocolo de PCR y visualización de amplificados	16
<b>4.- Resultados</b>	18
4.1.- Caracterización bioinformática de los ortólogos de DFG10 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	18
4.2.- Obtención de las líneas mutantes homocigotas insercionales alélicas en los ortólogos de DFG10.	24
4.2.1.- Selección de las líneas mutantes a estudiar	24
4.2.2.- Estrategia de confirmación de la condición génica de inserción de T-DNA en genoma de <i>Arabidopsis</i> y obtención de las plantas mutantes homocigotas.	25
4.2.3.- Búsqueda y detección de las líneas mutantes homocigotas insercionales alélicas a los ortólogos de DFG10.	31
4.3.- Caracterización fenotípica de las plantas mutantes insercionales homocigotas.	39



4.4.- Internalización del marcador fluorescente FM4-64 en las líneas insercionales homocigotas.	46
<b>5.- Discusión</b>	51
5.1.- Ortología de DFG10 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
5.2.- Determinación de mutantes insercionales homocigotas que interrumpen la región génica de At2g16530 y At5g16010.	53
5.2.1.- Mutante SALK_113221	54
5.3.- Caracterización fenotípica de las mutantes insercionales homocigotas.	55
5.4.- Internalización mediada por endocitosis del compuesto fluorescente FM4-64 en las mutantes insercionales homocigotas	58
5.5.- Estudios posteriores utilizando el compuesto <i>Sortin2</i>	58
<b>6.- Conclusiones</b>	60
<b>7.- Referencias</b>	61

## Listado de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del sistema de endomembranas y sus rutas descritas.	04
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la estructura génica de los ortólogos de DFG10 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	19
<b>Figura 3.</b> Predicción estructural de los productos proteicos de DFG10 y sus ortólogos en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	23
<b>Figura 4.</b> Representación de la posición de la inserción de T-DNA en las mutantes insercionales de los genes At2g16530 y At5g16010.	25
<b>Figura 5.</b> Estrategia del diseño de los partidores para determinar la condición génica del inserto de T-DNA.	28
<b>Figura 6.</b> Estrategia de la identificación de una inserción de T-DNA en el genoma de líneas de <i>A. thaliana</i> .	29
<b>Figura 7.</b> Estrategia de la determinación y obtención de las líneas mutantes insercionales homocigotas.	30
<b>Figura 8.</b> Resultados de la estandarización de la temperatura de hibridación para los partidores que amplifican el fragmento genómico de interés.	32
<b>Figura 9.</b> Búsqueda e identificación de las mutantes homocigotas SALK_117025.	34
<b>Figura 10.</b> Corroboración de la condición de homocigosis en la progenie de las plantas mutantes SALK_117025.	35
<b>Figura 11.</b> Búsqueda e identificación de las mutantes homocigotas SALK_105485.	36
<b>Figura 12.</b> Corroboración de la condición de homocigosis en las plantas mutantes SALK_105485.	37
<b>Figura 13.</b> Fenotipo en las plantas mutantes homocigotas de 7 días.	42
<b>Figura 14.</b> Fenotipo observado en las plantas mutantes homocigotas de 14 días.	43
<b>Figura 15.</b> Fenotipo de las hojas de la roseta observado en las plantas mutantes homocigotas de 35 días.	44
<b>Figura 16.</b> Cuantificación del número de hojas de la roseta de las plantas mutantes homocigotas de 35 días.	45
<b>Figura 17.</b> Curso temporal de la internalización del fluoróforo FM4-64 en las líneas mutantes SALK_117025 y SALK_105485.	49-50
<b>Figura 18.</b> Relación filogenética entre las secuencias ortólogas de DFG10 (inclusive) y las secuencias ortólogas de DET2 (inclusive).	52



## Listado de Tablas

<b>Tabla I.</b> Genes ortólogos de DFG10 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	09
<b>Tabla II.</b> Partidores utilizados en este seminario de título.	17
<b>Tabla III.</b> Protocolo de PCR utilizado en el seminario de título.	17
<b>Tabla IV.</b> Resumen de descriptores relacionados a la estructura génica en los ortólogos de DFG10 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	18
<b>Tabla V.</b> Descriptores bioquímicos y estructurales de DFG10 y sus ortólogos en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	20
<b>Tabla VI.</b> Resumen de las anotaciones de DFG10 y sus ortólogos en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	22
<b>Tabla VII.A.</b> Resumen de los resultados en la obtención de las líneas mutantes insercionales en la generación T1.	38
<b>Tabla VII.B.</b> Resumen de los resultados en la obtención de las líneas mutantes insercionales en la generación T2.	39
<b>Tabla VII.C.</b> Resumen de los resultados en la obtención de las líneas mutantes en la generación T3.	39

## Abreviaturas utilizadas

Aa.	Aminoácidos.
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> . Herramienta de búsqueda de alineamientos locales.
°C	Grados Celsius.
CDS	<i>Coding sequence</i> . Secuencia codificante.
cm.	Centímetros.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Nucleótidos trifosfato.
DTM	Dominio TransMembrana.
HM	Homocigotos.
HZ	Heterocigotos.
Kb	Kilobases.
mL, µL	Mililitros, microlitros.
mM, µM	Milimolar, micromolar.
p/v, v/v	Peso/volumen, volumen/volumen
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pI	Punto isoeléctrico
PVC	Complejo prevacuolar
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico.
s/i	Sin inserción.
S2	<i>Sortin2</i> .
SE	Sistema de endomembranas.
ssVSS	<i>sequence-specific Vacuolar Sorting Signals</i> . Señalización secuencia-específica de destinación vacuolar.
T-DNA	DNA de transferencia.
TGN	Red trans-Golgi
U	Unidad enzimática.
WT	Plantas silvestres.
<>	Menor que, mayor que.

## Resumen

El sistema de endomembranas es un sistema intracelular conservado en la división Eucariota que involucra a varios compartimientos subcelulares cuya función es la destinación correcta de proteínas dentro de la célula. En plantas, este sistema es esencial ya que es la base de muchos procesos fisiológico lo cual limita su estudio mediante genética clásica. Por estudios de genómica química, se identificaron compuestos llamados *Sortins*, los cuales alteran rutas del sistema de endomembranas tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como *Arabidopsis thaliana*. La mutante *dfg10* en levadura es resistente a *Sortin2* por lo que se ha postulado que DFG10 puede ser un blanco molecular del compuesto. Según herramientas bioinformáticas, este gen posee 3 genes ortólogos en *Arabidopsis thaliana*. Con el objeto de estudiar en plantas la función de estos tres genes y sus productos génicos, en este trabajo se buscaron, identificaron y caracterizaron mutantes insercionales en estos genes. Se obtuvieron mutantes con inserciones que interrumpen dos de los genes, At2g16530 y At5g16010. De ellas se aislaron mutantes homocigotas insercionales que poseen interrumpidos los loci correspondientes.

Estudios del fenotipo en mutantes homocigotas para cada uno de los loci interrumpidos indicaron que hay diferencias significativas con respecto a plantas silvestres en la longitud de la raíz primaria de 14 días de cultivo y en la dotación foliar en la estructura de la roseta en plantas de 35 días de cultivo. De esta manera se muestra que las inserciones en estos genes causan alteraciones importantes en la morfología y

estructura de la planta. Sin embargo el curso temporal del proceso endocítico no se ve afectado en estas líneas homocigotas con respecto a lo reportado en plantas silvestres.

Con este trabajo se han identificado mutantes de *Arabidopsis* en los genes ortólogos a DFG10 de levaduras, las que constituirían una herramienta importantísima para dilucidar la función de los respectivos productos génicos, a nivel del organismo y a nivel celular en cuanto a su participación en el sistema de endomembranas.

### *Abstract*

*Endomembrane system is an intracellular system conserved among the eucaryot division that involves many subcellular compartments which function is the correct protein targeting within the cell. In plants this system is essential because it regulates many physiological processes; this characteristic feature has hampered classical genetics studies of some molecular components of the system. By chemical genomics strategy, the compounds called Sortins were found, which are able to alter endomembrane system pathways of *Saccharomyces cerevisiae* as well as *Arabidopsis thaliana*. The yeast mutant *dfg10* is resistant to Sortin2, reason why it has been postulated that it could be a molecular target of this compound. According with bioinformatics tools, this gene has three orthologs on *Arabidopsis thaliana* genome. With the goal of studying the molecular function of these genes and their gen products in this work we looked for, identified and characterized insertional mutants in these genes. Mutants with insertion that interrupts two of the orthologs genes, *At2g16530* and *At5g16010*, were obtained. Among them, homozygous insertional mutants of the corresponding loci were identified.*

*Studies of phenotypes of the homozygous mutants for each interrupted locus showed statistical significant differences respect to wild type plants when analyzing to the primary-root length of 14 day-old plants and also to the number of rosette leaves of 35 day-old plants. These results show that insertion in these genes cause important alterations in morphology and structure of the plant. However, the time course of the endocytic process showed no differences on the homozygous insertion lines compared to what is reported for wild type plant.*

*This work has identified Arabidopsis mutants on Arabidopsis yeast-DFG10 orthologs genes, which will be very important tools to unravel function of the respective gene products, at the organism level as well as the cellular level and their relationship with the endomembrane system.*



## **1.- Introducción**

### **1.1- Sistema de endomembranas**

En todas las células los productos proteicos sintetizados en complejos ribosomales deben ser trasladados a los lugares donde su función sea requerida. Además, en sistemas eucarióticos muchas proteínas, para que puedan ejercer su función, deben ser procesadas en sitios específicos; algunas macromoléculas deben ser secretadas al medio externo así como otras deben ser internalizadas a la célula para cumplir su función o eventualmente ser degradadas. Estas funciones son moduladas por un sistema intracelular conservado en los eucariontes llamado sistema de endomembranas (SE). Este sistema está conformado clásicamente por compartimientos subcelulares donde ocurren procesos de síntesis y modificación de macromoléculas [el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi y la vacuola/lisosoma], y además por organelos implicados en el tráfico y distribución de proteínas [red trans-Golgi (TGN)], intermediarios post - Golgi [los endosomas y el complejo prevacuolar (PVC)], y por la membrana plasmática (Nebenführ A., 2002; Foresti O. & Denecke J., 2008; Alberts B. y col., 2008).

#### **1.1.1- Especificidad y rutas del tráfico vesicular**

Los componentes del SE están interconectados mediante el tráfico de vesículas del tamaño de unas decenas de nanómetros, las que en general se forman por el curvamiento progresivo inducido por proteínas accesorias y posterior estrangulamiento de la membrana de un organelo en zonas específicas (Alberts B. y col., 2008). El reconocimiento específico del destino subcelular está regulado principalmente por

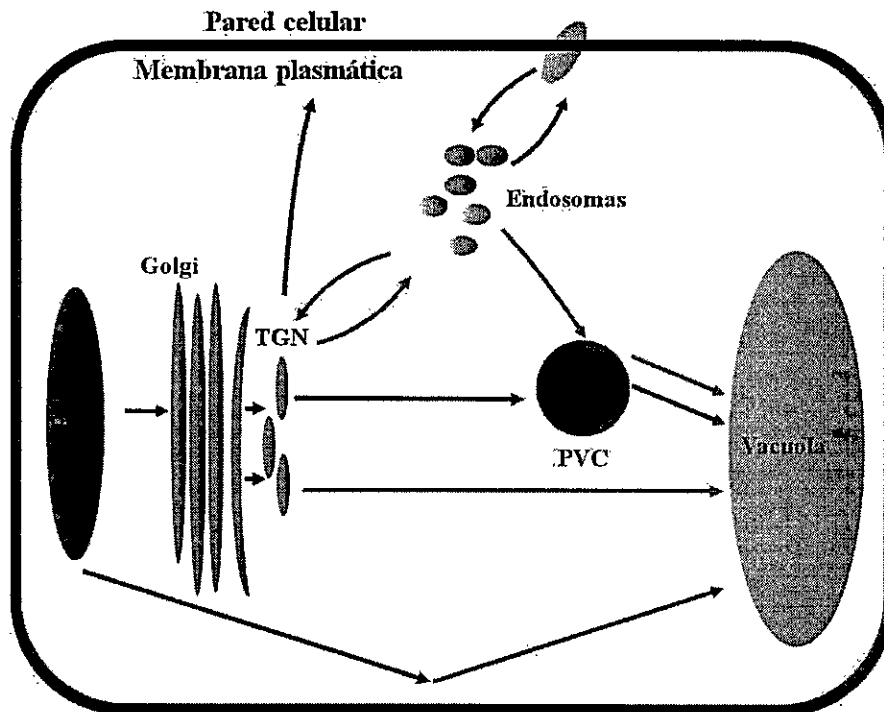
proteínas que reconocen e identifican a las vesículas según su origen y destino (Moreau P. y col. 2007; Alberts B. y col., 2008). Esta destinación del material proteico también conlleva un flujo de material membranoso (lipídico); éste es un mecanismo que asegura la existencia y mantenimiento de estos organelos en la célula (Carter C y col., 2004)

La especificidad en la destinación subcelular se refleja en el establecimiento de diferentes rutas esquematizadas en la figura 1 que muestran un alto grado de conservación entre diferentes modelos de estudio en eucariotes. Estas rutas presentan nodos o intersecciones entre ellas y tienen la característica de ser cíclicas, o sea existe un flujo retrógrado que devuelve elementos pertenecientes al organelo de origen (Foresti O. & Denecke J., 2008). En el sistema de endomembranas, una de las rutas es la ruta secretoria en la cual los productos proteicos sintetizados *de novo* son procesados en el RE, luego son llevados al Aparato de Golgi donde las proteínas son modificadas. Después se destinan al TGN y posteriormente son transportadas controlada y selectivamente, mediante vesículas, al compartimiento de destino, ya sea a componentes del sistema de endomembranas, a la membrana plasmática o al espacio extracelular (Alberts B. y col., 2008). Con respecto al tráfico de proteínas a la vacuola se han caracterizado rutas que siguen algunas proteínas proteolíticas vacuolares como la carboxipeptidasa Y (CPY), llamada ruta CPY en levaduras (Bowers K. & Stevens T., 2005) o ssVSS en plantas (Jolliffe N. y col., 2005) las que trafican a través del aparato de Golgi, PVC, y finalmente son destinadas a vacuola (flechas rojas en la figura 1) (Richter, S. y col., 2009). Se han reportado proteínas que trafican siguiendo esta ruta a la vacuola, pero no transitan por el PVC (flecha gris en la figura 1) (Jolliffe N. y col., 2005; Foresti O. & Denecke J., 2008). Una tercera vía en plantas se ha descrito entre RE y

vacuola sin transitar por Golgi, la cual siguen algunas proteínas de reserva en semillas (Jolliffe N. y col., 2005; Hanton S y col., 2006).

Otro proceso ligado al SE es la endocitosis la cual toma y enclaustra partículas tanto del exterior de la célula como elementos de la propia membrana plasmática para internalizarlas y transportarlas a compartimentos endosomales que pueden seguir su tránsito hacia PVC y después la vacuola o pueden ser recicladas a la membrana plasmática, proceso llamado reciclaje endocítico (Richter, S. y col., 2009; Ueda T. & Nakano A., 2002).

El sistema de endomembranas es altamente regulado. Se ha reportado que el SE es regulado por otros componentes subcelulares como el citoesqueleto, en especial el de filamentos de actina (Surpin M. & Raikhel N., 2004; Klyachko N., 2010), también por la composición lipídica de las membranas que conforman las vesículas y los organelos, ya que tienen influencia en la curvatura de membranas, en el reclutamiento de factores estabilizadores en proteínas de cubierta y en la correcta destinación de las proteínas (van Meer G. & Sprong H., 2004; Moreau P. y col. 2007; Boutté Y & Grebe M, 2009).



**Figura 1 – Representación esquemática del sistema de endomembranas y sus rutas descritas.** En flechas negras se muestra la ruta secretoria; en verde, la ruta endocítica. El transporte hacia la vacuola tiene diferentes alternativas: sigue la ruta Golgi - PVC (CPY/ssVSS, flechas rojas), sin transitar por PVC (flecha gris), o directamente desde el retículo endoplásmico (flechas azules). Se observa una sobreposición de rutas, en especial de endocitosis y ruta hacia la vacuola traficando por PVC.

### 1.1.2.- Esencialidad y limitación del estudio de SE en plantas.

En plantas el sistema de endomembranas no sólo comprende la destinación proteica, sino que es de una importancia tal que es esencial para la existencia del organismo, ya que se ha descrito que está implicado en importantes procesos fisiológicos y celulares como la comunicación intercelular, la expansión celular, la captación de nutrientes, la respuesta a patógenos, y la muerte celular programada (Carter C. y col., 2004; Kwon C., 2008; Cacas J., 2010). A nivel molecular se corrobora esta esencialidad ya que mutaciones en genes implicados en la especificidad del destino de las vesículas

provoca letalidad gametofítica y en genes que participan en biogénesis de vacuola provocan letalidad embriónica (Rojo E y col., 2001). Esta esencialidad limita la aplicación de la genética clásica en el estudio del SE, en la cual se provocan mutaciones en genes y se observa el fenotipo del organismo. Esto hace necesaria la utilización de nuevas estrategias sobre la aproximación científica para poder descubrir y caracterizar nuevos elementos del SE tanto a nivel molecular como celular.

### **1.2.- Biomoduladores y genómica química.**

Las plantas son organismos que regulan varios procesos celulares como la división y expansión celular a lo largo de sus órganos mediante compuestos químicos de bajo peso molecular o biomoduladores como lo son el ácido Indol-acético (auxinas), las giberelinas o el etileno, por lo tanto se hace patente la posible acción de otros compuestos bioactivos en procesos celulares vegetales. Esto, sumado a la utilización de biomoduladores que alteran alguna actividad biológica subcelular y que han sido de gran utilidad para estudiar diferentes procesos celulares como el tráfico endomembranoso (Robinson D. y col., 2008), da pie a que en los últimos años se haya desarrollado una nueva disciplina que combina la química orgánica de síntesis a gran escala con la genética, disciplina denominada genómica química.

Esta interdisciplina tiene como objetivo encontrar compuestos químicos que alteren ciertos procesos celulares al interactuar con sus blancos moleculares y que este efecto se refleje en fenotipos de fácil detección. Así pueden discernirse mediante estudios posteriores, nuevos elementos participantes en el proceso analizado, los cuales no habían sido estudiados por genética clásica ya sea porque causan letalidad en el

desarrollo o por redundancia génica (Kaschani F. & van der Hoorn R., 2007; Toth R. & Van der Hoorn R., 2009).

### **1.3.- *Sortins* alteran el tráfico endomembranoso en *Saccharomyces cerevisiae*.**

Los compuestos denominados *Sortins* (*Sorting inhibitors*) perturban el tráfico vesicular normal alterando la ruta de la proteína CPY en *Saccharomyces cerevisiae*, evidenciado por la secreción de esta proteasa vacuolar CPY, carboxipeptidasa Y, al medio extracelular. Estos compuestos fueron identificados en una búsqueda amplia de una colección de 5.000 compuestos químicos, dentro de la que catorce tenían la actividad biológica mencionada (Zouhar J. y col., 2004)

Para caracterizar la acción biológica de uno de estos compuestos, *Sortin2*, se realizó un estudio genético de hipersensibilidad al compuesto utilizando una librería de mutantes haploides monodelecionales de *S. cerevisiae* (Norambuena L. y col., 2008). Sus resultados arrojaron cepas hipersensibles al compuesto en las levaduras, por lo que se elaboró una lista con los genes delecionados que produjeron este efecto. En esta lista de genes se encontraba enriquecida las anotaciones relacionadas con el SE tanto en el aspecto funcional como en la localización subcelular con respecto a la representación que éstas presentan en el genoma de la levadura. Esto apoya la hipótesis de que *Sortin2* afecta específicamente a elementos pertenecientes al SE. Posteriormente, se realizaron estudios en la búsqueda de levaduras que fueran resistentes a *Sortin2* utilizando la misma colección de mutantes (Norambuena L., resultados no publicados). Si una cepa es resistente a *Sortin2* al no estar presente un producto génico, indicará que ese producto génico es necesario para que *Sortin2* tenga su acción, por lo que esta resistencia informa



sobre los candidatos a blanco molecular de este biomodulador y por consiguiente sobre su acción subcelular. Esto ayudará además a dilucidar componentes moleculares nuevos que estuvieran involucrados con el SE.

Los resultados de este análisis dieron a conocer que seis cepas mutantes de la colección son resistentes al efecto de Sortin2. Dentro de los genes afectados en estas mutantes se encuentran tanto elementos significativos en el tráfico vesicular como genes sin función conocida. Este último caso es el de YIL049w o DFG10 (*Defectuous Filamentous Growth 10*), el cual según bases de datos públicos como *Saccharomyces Genome Database* (SGD, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)), es un producto proteico que no posee una función conocida a nivel molecular y celular. Se ha descrito que está relacionado con el crecimiento filamentoso de la levadura en condiciones de falta de nutrientes (Mösch H. & Fink G., 1997). También se le ha descrito interacciones tanto físicas como genéticas con elementos involucrados en el SE (Haarer B. y col., 2006) y a proteínas que presentan localización nuclear, algunas de las cuales presentan reportes de interacciones a elementos proteicos que participan en el tráfico endomembranoso. La función de DFG10 es desconocida, pero presenta anotaciones provenientes de predicciones bioinformáticas como una proteína involucrada en el metabolismo de lípidos, en específico, de esteroides, ya que posee un dominio carboxilo terminal 3-oxo-5-alfa-esteroide-4-deshidrogenasa o 5-alfa esteroide reductasa. Estos antecedentes hacen interesante estudiar este posible blanco molecular de Sortin2, que podría tener una función en el SE.

#### **1.4.- *Sortin2* y su efecto en un modelo de organismos vegetales**

*Sortin2* es un químico que, al igual que en *Saccharomyces*, afecta el fenotipo de la planta *Arabidopsis thaliana*, organismo vegetal modelo por excelencia debido a su genoma relativamente pequeño y secuenciado, su corto ciclo de vida, su capacidad de autopolinización y la gran cantidad de semillas que genera una planta, lo cual permite estudios de segregación génica robustos en el corto plazo.

Se ha reportado que plántulas de 7 días de edad germinadas en *Sortin2*, experimentan una pérdida de la orientación con respecto a la gravedad en tallo y raíz y la presencia de raíces adventicias en conjunto con un acortamiento dosis-dependiente de la raíz primaria hasta casi desaparecer en comparación a su parte aérea (Pérez P., 2009). A nivel celular se destaca la alteración del tonoplasto (Zouhar J. y col., 2004) y la secreción al exterior celular del ortólogo funcional de CPY denominado AtCPY (Norambuena L., datos no publicados). Este fenotipo es análogo al observado en levaduras, por lo que entrega evidencia de la conservación existente entre las rutas del SE de plantas y levaduras, lo que hace de *Sortin2* un compuesto interesante para estudiar y diseccionar el tráfico endomembranoso en plantas.

#### **1.5.- Búsqueda de los ortólogos de DFG10 en *Arabidopsis thaliana*. Mutantes insercionales de T-DNA.**

Aunque existen peculiaridades entre los organismos modelos de levadura y planta mencionados, existe un grado de conservación importante entre las diversas rutas del SE. Entonces se puede hipotetizar que ortólogos en plantas para los putativos blancos moleculares de *Sortin2* en levaduras sean importantes para su acción en el

modelo vegetal. Se determinó que existen 3 posibles genes ortólogos a DFG10 en el genoma de *A. thaliana*, determinados por el programa integral computacional “YOGY” ([www.bahlerlab.info/YOGY/](http://www.bahlerlab.info/YOGY/)) y cuyos resultados fueron complementados por la herramienta bioinformática “WU-BLAST2 *protein*” del *European Bioinformatics Institute* (EBI – EMCL, [www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/)). Estos genes corresponden a los locus At1g72590, At2g16530 y At5g16010. Según alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas, estas presentan porcentajes de similitud de secuencia con respecto a DFG10 de alrededor del 50%, que se muestre en la tabla I.

**Tabla I – Genes ortólogos de DFG10 en *Arabidopsis thaliana*.** Se muestra tanto el porcentaje de identidad como el de similitud de la secuencia aminoacídica de cada locus con respecto a DFG10.

Gen ortólogo	% identidad	% similitud	E value
At1g72590	21,6	49,7	2,4e-10
At2g16530	20,5	43,6	9,9e-10
At5g16010	19,8	57,5	3,5e-08

En *Arabidopsis* se han generado colecciones de mutantes que están disponibles al uso público. Una de ellas corresponde a las mutantes SALK (Proyecto SALK, Alonso J.M. y col., 2003). Su característica es la inserción de un fragmento de T-DNA de varios kilobases de longitud dentro del genoma del organismo vegetal por lo que, dependiendo de donde se ubique este fragmento, puede interrumpir la estructura del locus y así eliminar su funcionalidad o disminuir su expresión. En este sentido, se ha reportado que líneas insercionales cuyo T-DNA se encuentra en elementos promotores de genes poseen una disminución e incluso eliminación de la expresión del transcrito objetivo. (Alonso,

J.M. y col., 2003). Así, utilizando mutantes insercionales de T-DNA que interrumpen los genes ortólogos a DFG10 en *Arabidopsis* se podría estudiar la funcionalidad de estos genes con respecto al tráfico endomembranoso y su participación en el modo de acción de *Sortin2*. El aporte de esta investigación daría nuevas luces sobre el sistema de endomembranas en el modelo vegetal.

## **2.- Objetivos**

### **2.1.- Objetivo general**

Identificar líneas mutantes de *A. thaliana* que presentan elementos insercionales en los genes At1g72590, At2g16530 y At5g16010 y evaluar el efecto de estas inserciones en las características fenotípicas de las plantas

### **2.2.- Objetivos específicos**

1.- Caracterización bioinformática de genes ortólogos a DFG10 en *Arabidopsis thaliana*.

2.- Identificación de líneas mutantes homocigotas insercionales de *Arabidopsis thaliana* en los genes At1g72590, At2g16530 y At5g16010.

3.- Caracterización del fenotipo morfológico de líneas mutantes homocigotas insercionales en los genes At1g72590, At2g16530 y At5g16010.

4.- Estudio del proceso endocítico en líneas mutantes insercionales homocigotas de los locus At1g72590, At2g16530 y At5g16010.

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- Bases de datos y programas bioinformáticos utilizados

Para caracterizar los locus ortólogos a DFG10 en *Arabidopsis thaliana* se utilizó la base de datos *The Arabidopsis Information Resource*, TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). En conjunto se utilizó la base de datos proteicos *Universal Protein Resource*, UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) e InterPro del Instituto Europeo de bioinformática (European Bioinformatics Institute, EMBL – EBI, [www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)) y de la base de datos proveniente de proteínas de membrana en plantas *Plant Membrane Protein Database*, ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>). Para analizar las respectivas secuencias aminoacídicas se ocuparon las herramientas WU-BLAST-p y CLUSTALW del Instituto Europeo de bioinformática; PROSITE ([www.expasy.ch/prosite/](http://www.expasy.ch/prosite/)) e INTERPRO y TOPPRED (<http://mobylye.pasteur.fr>). El patrón de expresión de cada gen fue analizado *in silico* utilizando la herramienta *The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics*, eFP Browser (<http://www.bar.utoronto.ca>).

Las mutantes insercionales utilizadas en este seminario fueron seleccionadas desde la colección SALK (SIGNAL, <http://signal.salk.edu>; sección *T-DNA express*) que es administrada por el banco de mutantes del *Arabidopsis Biological Resource Center*, ABRC (<http://abrc.osu.edu/>).

Para el diseño de partidores se ocupó la herramienta PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) utilizando las condiciones explicitadas en la figura 5 y lo reportado en SIGNAL sobre la ubicación del inserto de T-DNA para cada línea mutante. Para una mayor confiabilidad en la especificidad de la amplificación del fragmento deseado, se utilizó la herramienta BLAST– N de la base de datos TAIR para



cada par de partidores generados. Se eligieron los pares que solo y específicamente generaran *in silico* el amplificado deseado.

### **3.2.- Esterilización y estratificación de semillas**

Las semillas tanto de mutantes utilizadas como silvestres de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas mediante el protocolo especificado a continuación. Primero se lavaron las semillas en 1 mL de etanol 95% v/v por 5 minutos, para después retirar el alcohol y agitar por 15 minutos en una solución de etanol 70% v/v con Tritón®X - 100 0,1% v/v. Por último se lavaron las semillas en agua estéril 5 veces, retirando cada vez el líquido. Para estratificar las semillas se dejaron en 1mL de agua estéril a 4°C y en oscuridad por 2 días. Para asegurar la esterilidad se utilizó en todo el proceso una cámara de flujo laminar LAMINAIRE.

### **3.3.- Cultivo de plantas**

Las semillas esterilizadas y estratificadas se sembraron en condiciones estériles en placas de petri que contenían medio de cultivo (estéril) el cual poseía la siguiente composición: 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 fitoagar en grado de micropropagación 0,7% p/v, ajustado a pH 5,7.

Estas placas se colocaron verticalmente de forma tal que el crecimiento vegetativo fuera en sentido del vector gravedad. Se dejaron crecer en condiciones controladas de temperatura, (22°C), fotoperiodo (16 horas luz/ 8 horas oscuridad) y luminosidad (6000 lux).

Veinte días después de sembrar, estas plantas fueron trasplantadas a un soporte poroso de lana de roca (Grodan®). Este soporte fue embebido en un medio de cultivo llamado hidropónico 1X, el cual es descrito en 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. Este medio 1X estaba contenido en cajas de plástico forradas en aluminio de 18 x 13 x 9 cm., cuya tapa poseía 6 agujeros donde en cada una se ajustó el soporte de lana de roca y las plantas trasplantadas. Las condiciones de crecimiento fueron controladas: temperatura de 22°C y fotoperiodo de 16 horas luz (5000 – 8000 lux)/8 horas oscuridad.

### **3.4.- Fotografías, imágenes y análisis del fenotipo morfológico de plantas de *A. thaliana***

#### **3.4.1 – Análisis fenotípico de líneas insercionales homocigotas.**

A las plantas silvestres y mutantes insercionales homocigotas de 7, 14 días y 35 días de edad se fotografiaron con una cámara comercial Fujifilm modelo FINEPIX S1500 con un objetivo de 12X y utilizando como fondo luz blanca del transiluminador DESAGA D-6900. Para las diferentes mediciones en hojas y raíces de las distintas líneas se utilizó el programa computacional tpsDIG2 (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>). Estos datos fueron graficados, analizados estadísticamente y contrastados mediante el programa computacional Graphpad Prism 5.0®. El análisis estadístico fue

ANOVA de una vía con un número de muestras especificado para cada situación con posterior prueba post – ANOVA de Bonferroni, ambas con un  $p < 0,05$ .

#### **3.4.2 – Análisis del proceso endocítico en mutantes insercionales homocigotas de *Arabidopsis thaliana***

Plantas de 7 días fueron incubadas en el fluoróforo FM4-64 a 5  $\mu\text{M}$  durante 10 minutos en oscuridad a 4°C. Se tomaron imágenes a 0, 60 y 120 minutos después de la incubación con FM4-64 con el microscopio confocal Zeiss LSM 510 excitando con un láser de 543 nm y capturando la fluorescencia emitida con un filtro que rescata longitudes de onda mayores de 560 nm.

#### **3.5.- Extracción de ADN genómico**

A las plantas de 30 días de edad se le extrajo tejido foliar del cual se purificó ADN genómico. El protocolo de purificación realizado fue el siguiente: se molió en nitrógeno líquido, aproximadamente 100 mg de tejido, el cual fue incubado una hora a 65°C en solución tampón CTAB 2X (cetil-trimetil-amonio-bromidión 2% p/v, NaCl 1,4M, Tris HCl pH 8 100 mM, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,1% v/v). Luego fue centrifugado a 13.000g por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se le agregó 700  $\mu\text{L}$  de la solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), para después agitarse por 5 minutos. Se centrifugó a 8.000 rpm por 5 min, se rescató de la fase superior y se repitió lo anterior 1 vez. Luego se adicionó 650  $\mu\text{L}$  de 2-propanol y se incubó a -20°C por 60 minutos para luego centrifugarse por 15 minutos a 13.000g. Los últimos pasos consistieron en remover el sobrenadante, lavar el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de

etanol 70% v/v, una breve centrifugación, remover cuidadosamente el etanol y dejar secar el pellet. Finalmente se le adicionó 50  $\mu$ L solución tampón consistente en Tris HCl pH 8 10mM y EDTA 1mM y fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6.- Partidores utilizados, protocolo de PCR y visualización de amplificados.**

Para las diferentes reacciones de PCR realizadas se ocuparon los partidores mostrados en tabla II. El protocolo utilizado en todas las reacciones salvo las condiciones de temperatura en la estandarización de temperatura de hibridación es descrito en tabla III.

Para todas las reacciones de PCR de 25  $\mu$ L cada una, se ocupó 1  $\mu$ L de DNA genómico de la muestra a analizar en conjunto a la siguiente mezcla: 2,5  $\mu$ L solución tampón 10X con  $\text{MgCl}_2$  2mM, 1  $\mu$ L de cada partidor 10  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ L Paq5000<sup>TM</sup> DNA polimerasa 5U/ $\mu$ L (Stratagene®), 0,5  $\mu$ L solución de dNTPs 10 mM cada uno y 18,8  $\mu$ L de agua.

Para determinar la presencia y tamaño del amplificado se utilizó agarosa grado analítico en geles de 1% p/v en TAE 1X (Tris-base pH 8 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA pH 8 1mM). 5  $\mu$ L de cada muestra de PCR fue mezclada con 1  $\mu$ L de solución de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v, ficol 30% p/v), fue cargada en un pocillo del gel y corrida a 100V por 30 minutos. Luego, el gel se incubó en bromuro de etidio 2mg/L por 20 minutos y se observó en transiluminador SYNGENE modelo SYDR/2082. En todos los geles se usó 5 $\mu$ L de marcador de peso molecular Gene Ruler<sup>TM</sup> 1Kb a 50 ng/ $\mu$ L.

**Tabla II – Partidores utilizados en este seminario de título.**

Locus A.T.	Partidor	Secuencia (5' – 3')	Nº nt.
At2g16530	G_040317_5'	CCACACCACTCCAATAACAT	20
	G_040317_3'	CAAAGGCTACTCAAATCGTC	20
	G_113221_5'	CTCAAACCTCCGGAGATACC	20
	G_113221_3'	CCATCTGGTTGAAGTGGA	18
	G_117025_5'	GCTTTCTCGTTTTCAATCTGG	21
	G_117025_3'	AGAATATGTTGCGGTCAACG	20
At5g16010	G_105485_5'	AGGGAACACTTTGGGAGAT	19
	G_105485_3'	TAGCCATCCCTCCACTGTA	19
	G_074515_5'	GAAGGAGATGGACTTGCAG	19
	G_074515_3'	GCTAGAAACGCAGGTGTGTA	20
-	Actina_5'	CACACTTTCTACAATGAGCT	20
-	Actina_3'	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT	20
-	Lb	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	19

**Tabla III – Protocolo de PCR utilizado en el seminario de título.**

Fase	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	1	94	5 min	1
2	1	94	30 s	37
	2	58	40 s	
	3	72	50 s	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

## 4.- Resultados

### 4.1.- Caracterización bioinformática de los ortólogos de DFG10 en *Arabidopsis thaliana*.

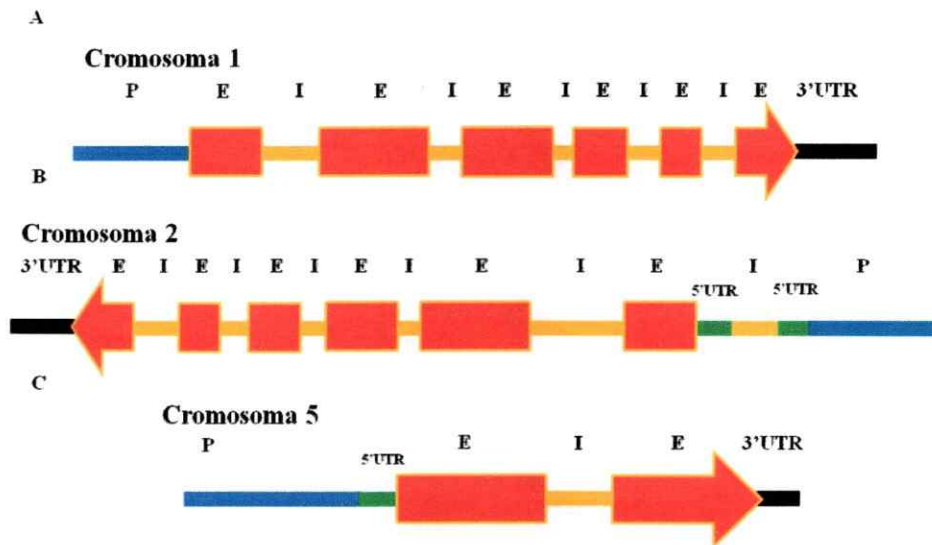
Luego de determinar los posibles ortólogos de DFG10 en *Arabidopsis thaliana* es necesaria una descripción de la información contenida en las bases de datos públicos, tanto de su estructura génica como de su transcrito, su expresión tisular y ubicación subcelular de sus productos proteicos. En la tabla IV se resumen las características de la estructura génica de los ortólogos de DFG10, la cual se plasma en el esquema mostrado en la figura 2. Se observa que estos genes están presentes en distintos cromosomas de *Arabidopsis thaliana* y que sus tamaños génicos son distintos entre sí, sin embargo el tamaño del marco de lectura abierto (CDS) es más uniforme.

**Tabla IV – Resumen de descriptores relacionados a la estructura génica en los ortólogos de DFG10 de *Arabidopsis thaliana*.**

Locus	Cromosoma	Tamaño gen (pb)	Nº exones	Nº intrones	Tamaño RNAm (pb)	Tamaño CDS (pb)
At1g72590	1	1472	6	5	1046	963
At2g16530	2	2335	6	6	1427	1032
At5g16010	5	1193	2	1	969	807

Para observar el patrón de expresión de estos transcritos a nivel tisular y de desarrollo se utilizó la herramienta bioinformática eFP (*electronic Fluorescent Pictograph*; <http://www.bar.utoronto.ca>) la cual se basa en la información pública de datos de expresión génica de genes de *Arabidopsis thaliana*. Este análisis describe como factor común para los tres genes, la presencia de sus transcritos en toda la planta y a lo largo de su desarrollo, aunque el nivel de expresión de At5g16010 es mucho mayor con

respecto a los otros dos. Los transcritos de At2g16530 y At1g72590 se expresan más en pétalos y raíces, mientras que el de At5g16010 se encuentra en mayor cantidad en las hojas maduras y sépalos de la planta.



**Figura 2 – Representación esquemática de la estructura génica de los ortólogos de DFG10 de *Arabidopsis thaliana*.** Se muestra en la figura las diferentes regiones de los locus: promotor (P, barra azul), 5'y 3' UTR (barras verde y negra, respectivamente), intrones (I, barra amarilla) y exones (E, cajas y flecha rojas) de los genes At1g72590 (A), At2g16530 (B) y At5g16010 (C). El sentido de cada flecha roja indica la dirección del locus con respecto a la dirección del cromosoma donde se halla.

Con respecto a sus productos proteicos, se observa que los de Arabidopsis son de tamaño más grande que DFG10 y que descriptores bioquímicos como el punto isoeléctrico (pI) presentan valores similares entre ellos, alrededor de 9,5 (tabla V), indicando una estructura primaria proteica similar en cuanto a sus aminoácidos cargados y una carga formal positiva a pH fisiológico.

**Tabla V – Descriptores bioquímicos y estructurales de DFG10 y sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana*.**

Producto Proteico	Nº de Aa.	pI	Nº dominios transmembrana (DTM)
DFG10	253	9,93	6
At1g72590	320	9,49	7
At2g16530	343	9,37	6
At5g16010	268	9,73	6

En la tabla VI se resumen las anotaciones que poseen hasta este momento DFG10 y sus 3 ortólogos encontrados en *Arabidopsis*. Se ve claramente que a todos se les ha asignado la misma función molecular por poseer el dominio 5- $\alpha$ -esteroide-4-dehidrogenasa. Este dominio está implicado en el metabolismo de lípidos, sin embargo la falta de evidencia experimental es crítica para determinar su función. Esto se da también en cuanto a la localización subcelular de DFG10 y At1g72590, ya que la información de las bases de datos es contradictoria respecto a la ubicación en citoplasma en conjunción y el hecho de ser proteínas integrales de membrana. Aportando un poco más a la información con respecto a la ubicación dentro de la célula se utilizó una base de datos integrada, ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>), la cual predice que At1g72590 estaría localizada en el sistema de endomembranas, específicamente en la ruta secretoria. Además, en los tres ortólogos se predice anclaje N-terminal a la membrana. Este antecedente sumado al reporte de que el producto de At2g16530 se ubica en el retículo endoplasmático (Tian G. y col., 2004) indicaría una presencia importante de genes ortólogos a DFG10 en *Arabidopsis* en el sistema de endomembranas.

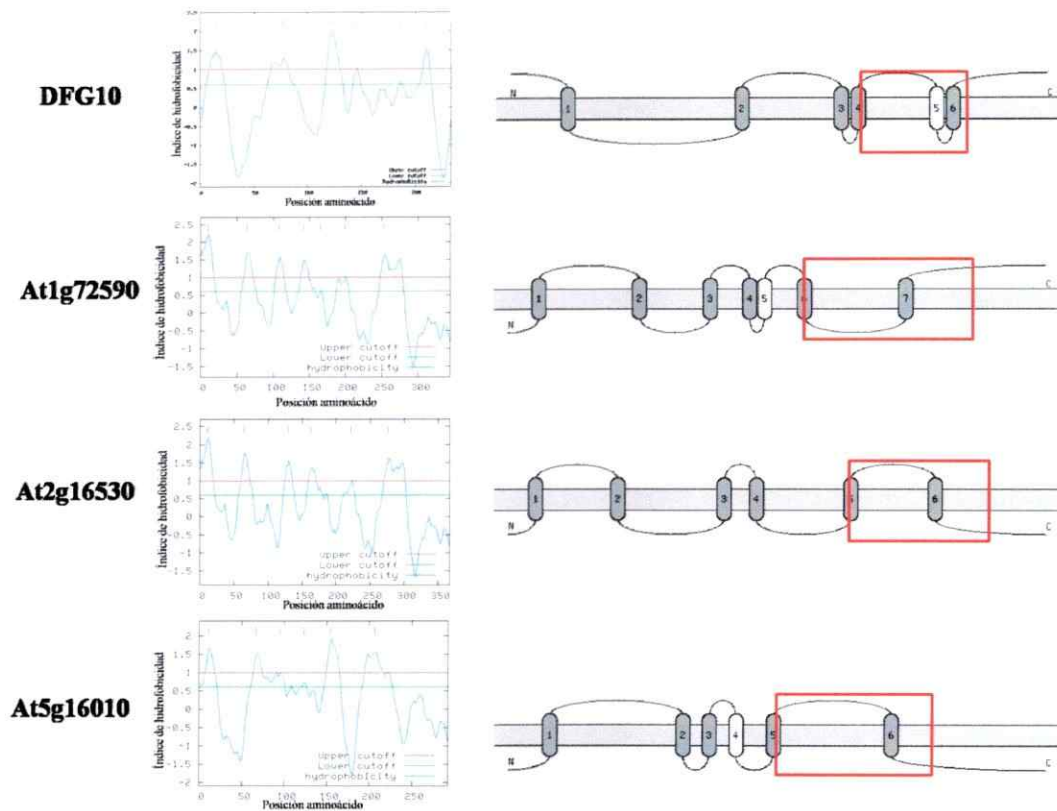


Utilizando la herramienta bioinformática que predice dominios transmembrana, TOPPRED (<http://mobyli.pasteur.fr>), se encontró que DFG10 y sus ortólogos son proteínas altamente hidrofóbicas en las cuales se predice la existencia de 6 dominios transmembranas (DTM) en 3 de los genes y 7 en At1g72590 (Tabla V, figura 3).

PROSITE ([www.expasy.ch/prosite](http://www.expasy.ch/prosite)) es un programa que predice dominios proteicos. Este fue utilizado para ubicar el dominio 5- $\alpha$ -esteroide reductasa en cada secuencia aminoacídica. Se informa que este dominio se compone de aproximadamente 80 aminoácidos ubicándose en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Analizando las secuencias estudiadas, se observa que este dominio completo está presente en todas las proteínas estudiadas y, combinando con la información de TOPPRED, este dominio se caracterizó por comprender al menos dos DTM, uno de forma íntegra y el otro en parte, entre los cuales se incluye un "loop" de más de 30 aminoácidos (figura 3), por lo que indicaría una preservación de la estructura terciaria de los productos proteicos estudiados.

**Tabla VI – Resumen de las anotaciones de DFG10 y sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana*.** Se predice para las cuatro secuencias aminoacídicas la misma función molecular y proceso celular. La anotación de estos genes se basa en análisis de referencia electrónica (IEA, *Inferred from Electronic Annotation*) ó de ensayos directos (IDA, *Inferred from Direct Assay*).

<b>Producto Proteico</b>	<b>Localización sucelular</b>	<b>Función molecular</b>	<b>Proceso</b>
DFG10	Citoplasma, integral a membrana (IEA)	3-oxo-5- $\alpha$ -esteroide- 4-dehidrogenasa, oxidoreductasa que actúa en grupo CH - CH donador (IEA)	Metabolismo de lípidos (IEA)
At1g72590	Citoplasma; integral a membrana (IEA); sistema endomembranoso (IEA)	3-oxo-5- $\alpha$ -esteroide- 4-dehidrogenasa, oxidoreductasa que actúa en grupo CH - CH donador (IEA)	Metabolismo de lípidos (IEA)
At2g16530	Retículo endoplasmático (IDA), integral de membrana (IEA)	3-oxo-5- $\alpha$ -esteroide- 4-dehidrogenasa, oxidoreductasa que actúa en grupo CH - CH donador (IEA)	Metabolismo de lípidos (IEA)
At5g16010	Cubierta del cloroplasto (IDA), integral de membrana (IEA)	3-oxo-5- $\alpha$ -esteroide- 4-dehidrogenasa, oxidoreductasa que actúa en grupo CH - CH donador (IEA)	Metabolismo de lípidos (IEA)



**Figura 3 – Predicción estructural de los productos proteicos de DFG10 y sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana*.** Se muestran los perfiles de hidrofobicidad y la representación de los dominios transmembrana de cada una de las secuencias proteicas estudiadas utilizando el criterio de Kite-Doolittle. En los perfiles de hidrofobicidad se exponen dos umbrales para determinar un nivel medio (verde) o alto (rojo) de confiabilidad en la predicción de los elementos transmembrana, los cuales se representan de color blanco y gris, respectivamente. Las cajas rojas representan la posición del dominio 5- $\alpha$ -esteroide reductasa descrito para cada proteína.

## **4.2.- Obtención de las líneas mutantes homocigotas insercionales alélicas en los ortólogos de DFG10.**

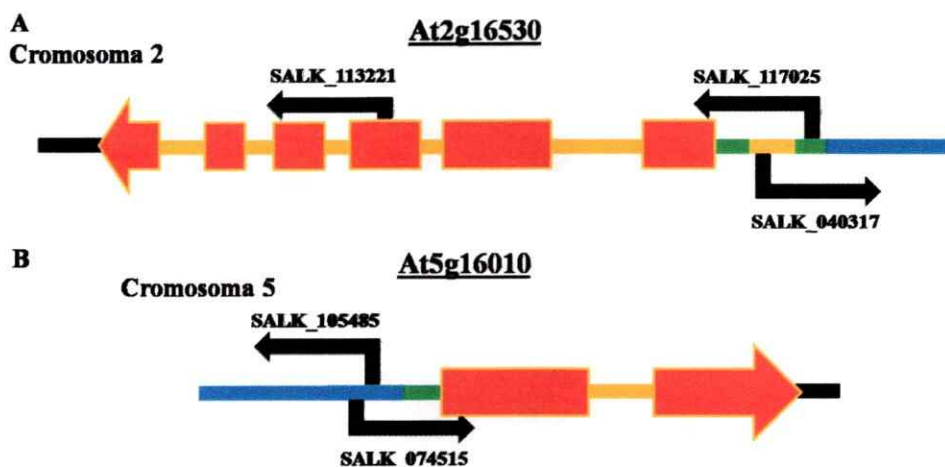
### **4.2.1.- Selección de las líneas mutantes a estudiar**

Para estudiar los genes identificados en *A. thaliana* como ortólogos a DFG10, una estrategia que se puede seguir es estudiar el efecto que produce la alteración de los niveles de los correspondientes productos génicos. En plantas esto se puede lograr mediante el uso de mutantes en las cuales se interrumpe el o los genes de interés. La colección de mutantes de *A. thaliana* SALK se caracteriza por utilizar un elemento insercional, fragmento de T-DNA de varios kilobases, para interrumpir el genoma con la idea de anular la funcionalidad de productos génicos, ya sea alterando la estructura primaria de su producto proteico o disminuyendo la expresión de su transcrito. Esta inserción puede ubicarse en cualquier parte del genoma por lo que es necesaria una selección de aquellas líneas que presenten este inserto dentro del contexto génico de los loci de interés en *A. thaliana*.

Así, se seleccionaron 5 líneas esquematizadas en la figura 4: tres en el gen At2g16530 y dos en el gen At5g16010. De las líneas insercionales del gen At2g16530, una interrumpe un exón del locus (SALK\_113221), mientras que las otras 2 interrumpen elementos no traducibles. Con respecto al locus At5g16010, se seleccionaron líneas que presentan la inserción en el promotor cerca del inicio de la transcripción (menos de 300 pb río arriba del inicio de la transcripción).

El locus At1g72590 no posee líneas insercionales que sean interesantes de estudiar, debido a que las líneas reportadas que interrumpen su constitución génica presentan la inserción en una ubicación cercana a 1000 pb río arriba del inicio de su

transcripción, por lo que lo más probable es que no tendría efecto en la disminución de la expresión génica del transcrito.



**Figura 4 – Representación de la posición de la inserción de T-DNA en las mutantes insercionales de los genes At2g16530 y At5g16010.** En A se esquematiza las 3 mutantes seleccionadas del gen At2g16530 y en B, 2 para el locus At5g16010, representándose ambos genes de la misma manera que en la figura 2. Las flechas negras esquematizan la ubicación de la inserción dentro del locus; la dirección de la flecha indica el sentido que posee el inserto con respecto al genoma. El nombre de cada mutante se encuentra junto a su flecha negra más cercana.

#### 4.2.2.- Estrategia de confirmación de la condición génica de inserción de T-DNA en genoma de *Arabidopsis* y obtención de las plantas mutantes homocigotas.

El banco de mutantes SALK, ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*), desde donde se seleccionaron las líneas a utilizar, menciona la necesidad de corroborar si el inserto se presenta en la ubicación correcta, ya que se han reportado errores en algunas ocasiones (<http://abrc.osu.edu/>). Por esta razón una vez recibidas las semillas provenientes de ABRC se realizaron los análisis de verificación correspondientes.

Por otra parte, es más probable que las líneas insercionales homocigotas de este organismo presenten un fenotipo alterado con respecto a la planta silvestre debido a un producto génico de expresión disminuida o funcionalidad nula, ya que la presencia de una de las copias del gen (condición de heterocigosis para la inserción) puede ser suficiente para mantener la funcionalidad tanto a nivel celular como del organismo. Por lo tanto es necesaria una técnica que evalúe la presencia de la inserción y la condición de inserción heterocigota u homocigota del inserto de T-DNA.

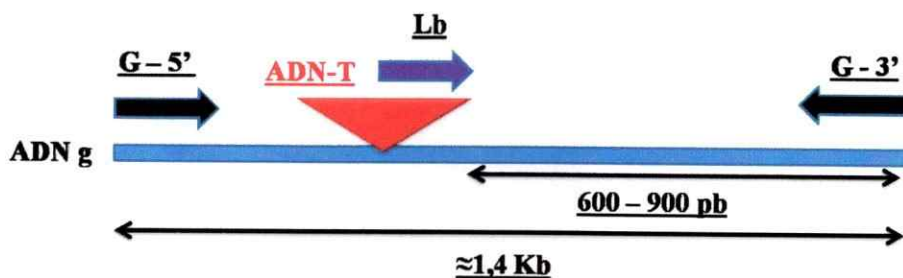
La técnica de amplificación de fragmentos por PCR y posterior electroforesis permite identificar mutantes con condiciones génicas distintivas, pero es necesario un diseño de partidores específicos para cada línea. En la figura 5 se esquematiza el diseño de los partidores utilizados para determinar la condición génica del inserto. Para esto es importante tomar en cuenta el sentido que posee el inserto de T-DNA en la región de interés. En uno de los extremos de la inserción hibrida un partidor previamente diseñado llamado Lb que es específico para esa región y no hibrida el genoma de la planta. Si el partidor Lb está en sentido 5'-3' del genoma (figura 5), entonces se diseña un partidor que hibride el genoma de Arabidopsis que se encuentre a 600 pb río abajo del sitio de inserción del fragmento (G-3'). De esta manera si la inserción está presente, se amplificará un fragmento de aproximadamente 600 pb. Sin embargo, por las características de la metodología utilizada para determinar la ubicación del inserto en el genoma de Arabidopsis, siempre hay un intervalo entre 0 a 300 pb de inexactitud en la posición del T-DNA, lo cual se ve reflejado en la variabilidad entre 600 a 900 pb del tamaño del fragmento amplificado al utilizarse partidores Lb y G-3' en la reacción de PCR. Para determinar si la inserción está presente en los dos alelos (condición

homocigota), se diseñó otro partidor genómico (G-5') a una distancia de aproximadamente 1400 pb río arriba del G-3' en el genoma de la planta silvestre. Con este par de partidores se amplificará el gen sin inserción. Ahora, si el partidor Lb se encuentra en dirección 3'-5' (SALK\_113221 por ejemplo) el orden del diseño y por ende las distancias de los dos partidores genómicos se intercambian.

Así, al observar en un gel de agarosa el patrón de bandas amplificadas en las distintas condiciones de la reacción de PCR se puede identificar fácilmente la condición génica del inserto en una planta. Como se explicita en la figura 6, las muestras sin inserción no mostrarían banda en los carriles donde se busca la existencia del inserto en la ubicación correcta (carril LB). Las plantas heterocigotas (HZ) se evidenciarían por amplificar tanto el fragmento de 1,4Kb al usar los partidores genómicos (carril G), como el de 600 pb al usar en un PCR el partidor Lb con su partidor genómico correspondiente (carril LB). En cambio, las plantas homocigotas (HM) para la inserción de T-DNA amplificarían la banda esperada en el carril LB, pero no en su carril G, debido a que la interrupción que provoca la inserción del fragmento en la sección génica de Arabidopsis analizada está en los dos alelos.

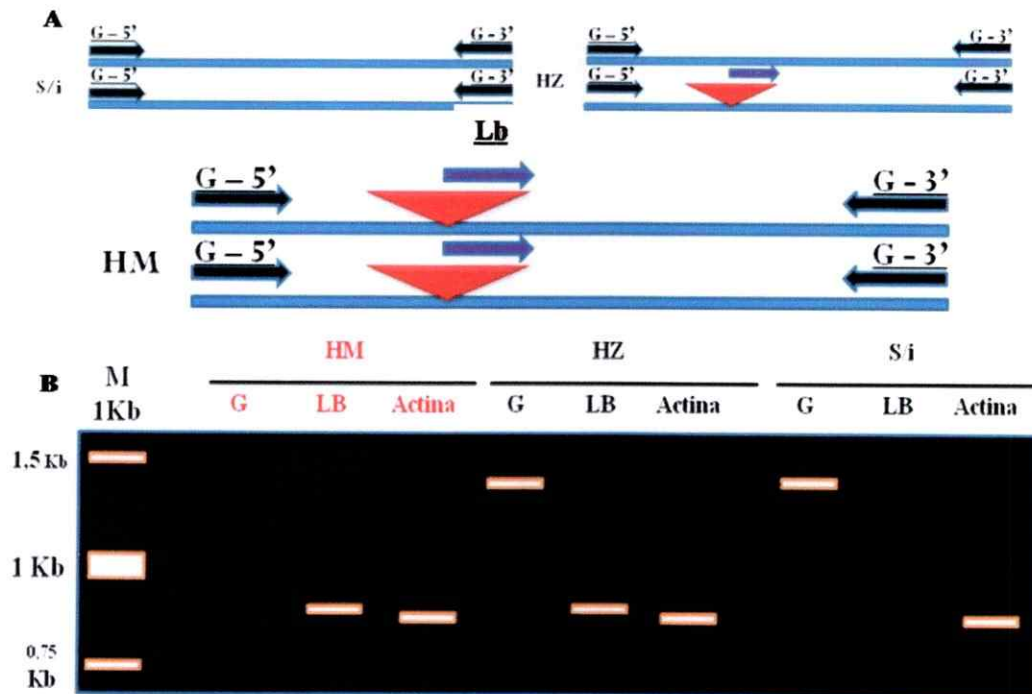
El carril de integridad de calidad de la muestra de DNA, la cual se verifica amplificando una porción del gen de actina, además cumple la función de corroboración de homocigosidad, ya que aclara la posibilidad de la no amplificación del fragmento por mala calidad de la muestra en vez de la inserción del T-DNA de forma homocigota (figura 6.B).

Sin embargo, la determinación de la genotipificación de las plantas homocigotas necesita de la corroboración de la heredabilidad del fragmento de T-DNA en condición de homocigocidad. La estrategia para esta corroboración se esquematiza en la figura 7 que contempla el análisis de la condición de homocigosis en la progenie proveniente de la autopolinización de la planta parental homocigota. Esto se realiza porque, si se diera el caso de algún falso positivo en la detección de la condición génica mediante PCR (figura 6) que conlleve a una equivocación, ésta se evidenciaría en su descendencia (T2). Asumiendo que este proceso sigue una segregación mendeliana, si la progenie de una planta parental (T1, fig. 7.B), supuestamente homocigota, da como resultado la segregación del inserto, o sea la presencia de plantas tanto heterocigotas como sin inserción, significa que esta planta era en realidad heterocigota para la inserción. Por este motivo se hace necesaria la confirmación de la homocigocidad en la progenie de una parental que haya mostrado un resultado positivo en la detección de la condición génica.

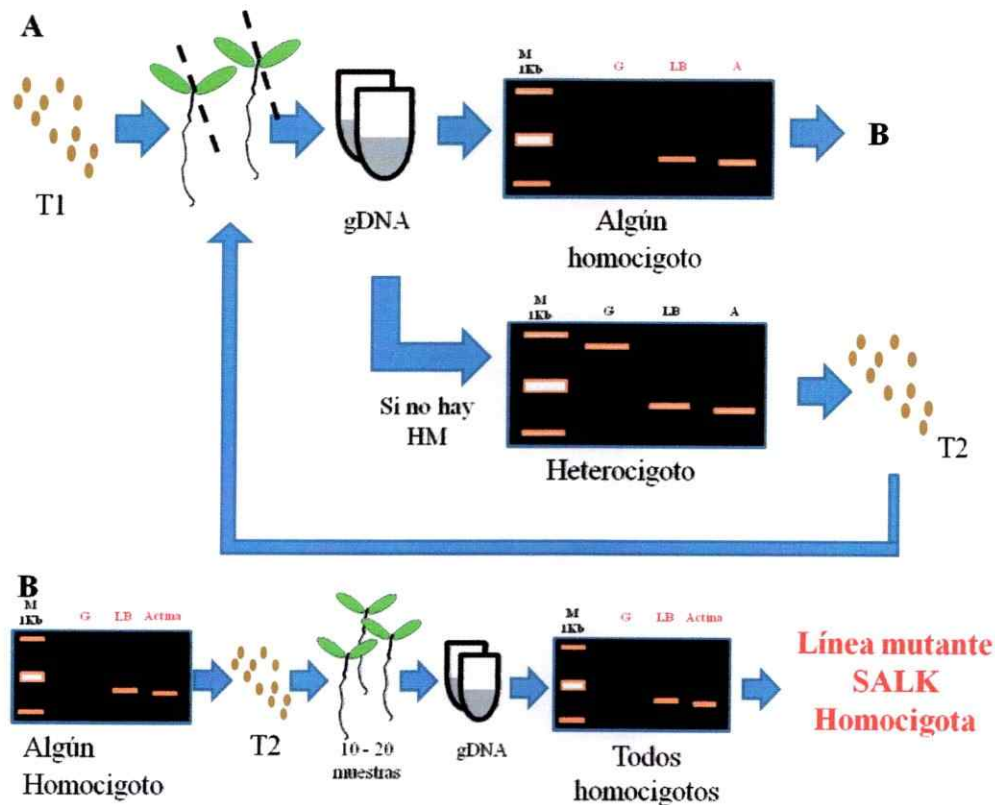


**Figura 5 – Estrategia del diseño de los partidores para determinar la condición génica del inserto de T-DNA.** El esquema representa un alelo del gen en la región génica de interés. El partidor Lb hibrida específicamente en extremo LB de T-DNA; los partidores genómicos (G – 5' y 3') hibridan el genoma de la planta (DNAg). G-3' se diseña de manera tal que se encuentre a una distancia de aproximadamente 600 pb del extremo LB del T-DNA. El partidor G-5' se diseñó ubicándose aproximadamente a 1,4 Kb de distancia río arriba del partidor G-3' considerando que no existe esta inserción.





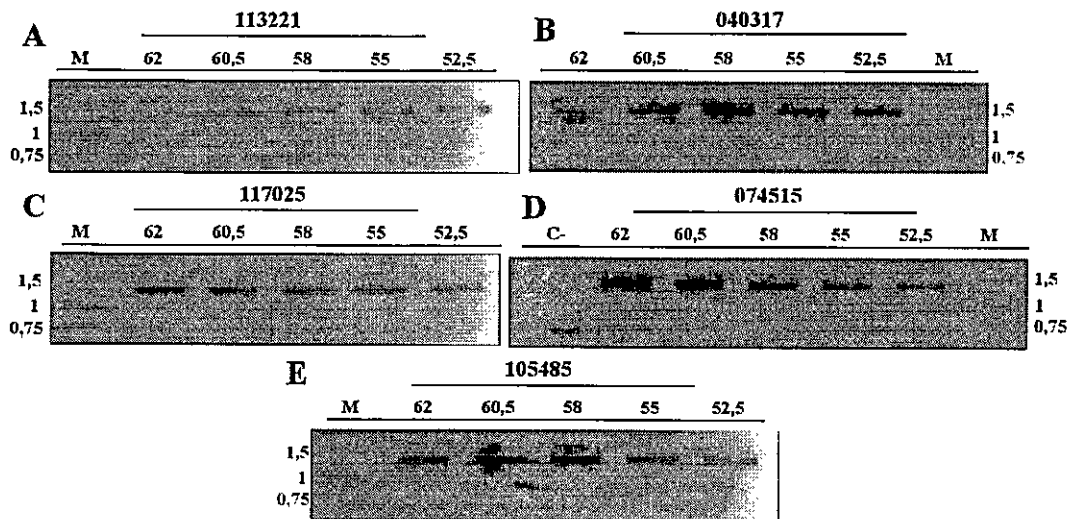
**Figura 6 – Estrategia de la identificación de una inserción de T-DNA en el genoma de líneas de *A. thaliana*.** En A las líneas azules representan ambos alelos del elemento génico estudiado donde se esquematiza cuando no posee inserción (s/i), la condición de heterocigocidad (HZ) y de homocigocidad (HM) del fragmento de T-DNA que lo interrumpe en las líneas mutantes. Se esquematizan los partidores que reconocen el DNA genómico (G's) y el partidor que reconoce un extremo de la inserción de T-DNA, Lb. El criterio del diseño de los correspondientes partidores y los tamaños de las bandas se describió en la figura 5. En B se presenta un esquema de la migración electroforética de los productos de PCR esperados para las diferentes condiciones de amplificación. Se espera que los partidores LB y G3' (**carril LB**) amplifiquen una banda de 600 a 900 únicamente cuando la inserción este presente tanto en líneas HZ como en HM. Sin embargo los partidores G5' y G3' (**carril G**) amplificarán una banda de 1,4 Kb aproximadamente sólo en aquellas plantas que correspondan a HZ y las que no poseen la inserción de T-DNA (S/i) . Para corroborar la integridad del DNA genómico aislado se utilizan partidores que amplifican un fragmento del gen de actina (**carril actina, A**). Estándares de tamaño molecular se encuentran en carril M, donde para cada banda se indica apropiadamente su tamaño.



**Figura 7 – Estrategia de la determinación y obtención de las líneas mutantes insercionales homocigotas.** En A se muestra el análisis de búsqueda y determinación de muestras homocigotas. El DNA de plantas mutantes provenientes del banco de mutantes, será analizado según lo descrito en la figura 6. Si no se encuentra algún homocigoto se procede a la recolección de la progenie (T2) de alguna de las plantas heterocigotas identificadas y se vuelve a buscar plantas homocigotas para la inserción. Si se encuentra alguna homocigota (T1) en A, se rescata su progenie (T2) de manera de analizar la condición génica de 10 a 20 plantas T2 (B). Si el 100% de ellas presentan la inserción en homocigosis se confirma esta línea como homocigota.

#### **4.2.3.- Búsqueda y detección de las líneas mutantes homocigotas insercionales alélicas a los ortólogos de DFG10.**

Para probar la especificidad de los partidores diseñados para amplificar la región génica en donde se localizan las inserciones en las mutantes SALK, se realizó una amplificación por PCR utilizando DNA genómico de una planta silvestre como molde. Además, para estandarizar la temperatura de hibridación de los partidores, se realizó el PCR a 5 temperaturas de hibridación distintas. En la figura 8 se observan los resultados, donde se destaca la presencia de un solo producto del tamaño esperado (aproximadamente 1,4Kb) para todos los pares de partidores que amplifican la región genómica en donde se ubican las inserciones en las líneas mutantes SALK\_113221, 040317, 117025, 074515 y 105485. Sólo en la condición a 52,5°C en partidores a utilizar en líneas SALK\_074515, se observa una banda inespecífica (figura 8.D). Además se obtuvo una disminución de la intensidad del amplificado a 62°C en 8.A y 8.B. Para evitar posibles amplificaciones inespecíficas y normalizar todos los protocolos donde se utilicen estos pares de partidores se determinó que 58°C es una temperatura de hibridación óptima a usar en análisis posteriores.



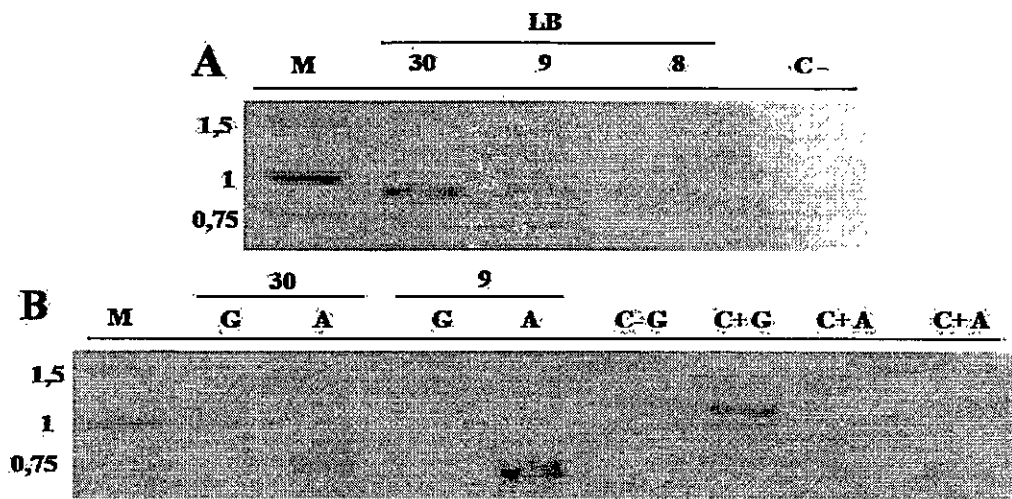
**Figura 8 – Resultados de la estandarización de la temperatura de hibridación para los partidores que amplifican el fragmento genómico de interés.** Se observa la amplificación de los fragmentos genómicos de interés de línea silvestre, en donde se ubican las inserciones en las líneas mutantes SALK\_113221 (A), 040317 (B), 117025 (C), 074515 (D) y 105485 (E). La temperatura de hibridación en °C utilizada en cada condición se encuentra indicada sobre cada carril. Estándares de tamaño molecular se encuentran en carril (M) en donde se especifican los tamaños en Kb. C-, control negativo de la amplificación sin DNA genómico.

Luego se procedió a corroborar la presencia de la inserción en las respectivas mutantes en conjunción con la búsqueda de aquellas plantas que presentaran homocigosidad del T-DNA en su genoma. Para el locus At2g16530, se puede observar la correcta ubicación del inserto dentro de 2 plantas en la línea SALK\_117025 (figura 9.A, plantas 9 y 30). Todas las plantas que presentaron la inserción en la posición esperada (figura 9.A) presentan el fragmento de T-DNA en homocigosis (figura 9.B). Para corroborar este resultado se estudió la segregación del inserto de T-DNA. En la figura 10 se presenta este análisis en la progenie de planta 9, SALK\_117025. De las 10

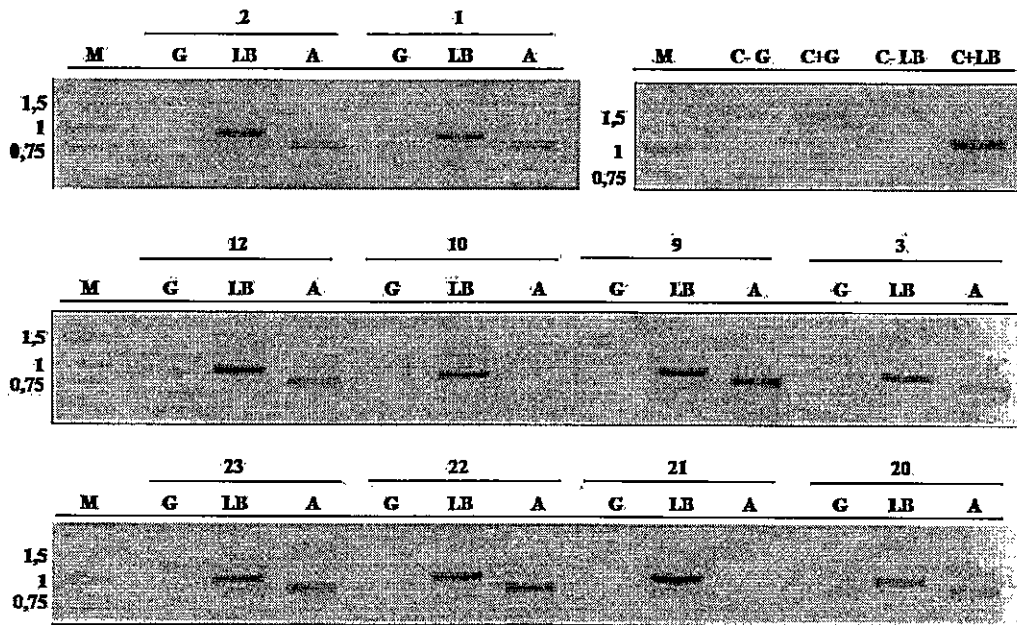
plántulas estudiadas, todas presentaron el patrón caracterizado para la condición de homocigosis, sin embargo en una de éstas el control de calidad del DNA, actina, no fue posible detectarlo.

Con respecto al locus At5g16010, se encontraron 4 plantas de la línea SALK\_105485 con el inserto en la posición reportada en el banco de mutantes (figura 11.A). Como se muestra en la figura 11.B, todas ellas también presentaron el patrón homocigoto para la inserción. En la figura 12, se analizó el genotipo de la progenie producto de la autopolinización de una de las plantas identificadas como homocigota, planta 115. Todas las 16 plantas de la progenie muestran la presencia del inserto en la posición esperada dentro de sus genomas (figura 12.A) en la condición de homocigosis (figura 12.B).

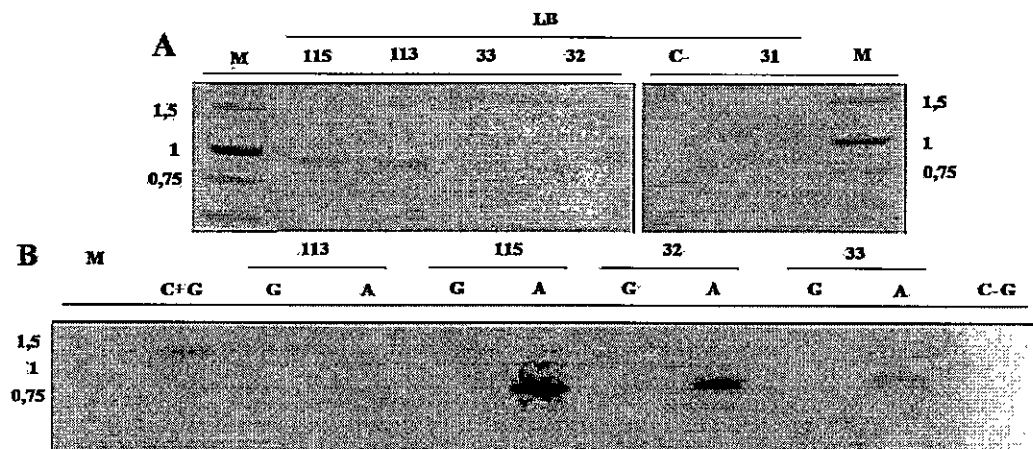
En conjunto, estos resultados muestran que fue posible obtener líneas mutantes homocigotas que interrumpen los genes At216530 y At5g16010, cada uno por separado.



**Figura 9 - Búsqueda e identificación de las mutantes homocigotas SALK\_117025.** Se muestra la electroforesis en geles de agarosa 1% de los fragmentos amplificados por PCR, donde se utilizaron partidores para determinar la presencia y ubicación correcta del inserto de T-DNA (carril LB, en A) y su condición génica por la amplificación del fragmento de 1,4 Kb (carril G, en B) en plantas pertenecientes a la línea SALK\_117025, cuyo número de identificación se indica sobre cada carril. El control de calidad de cada muestra de DNA, corresponde a la amplificación del gen de actina se observa en (carril A, en B). Se utilizó para los controles positivos (C+) DNA de planta silvestre; C-, control negativo, sin DNA. Los pesos moleculares de los marcadores (M) se indican apropiadamente a los bordes de cada sección (en Kb)

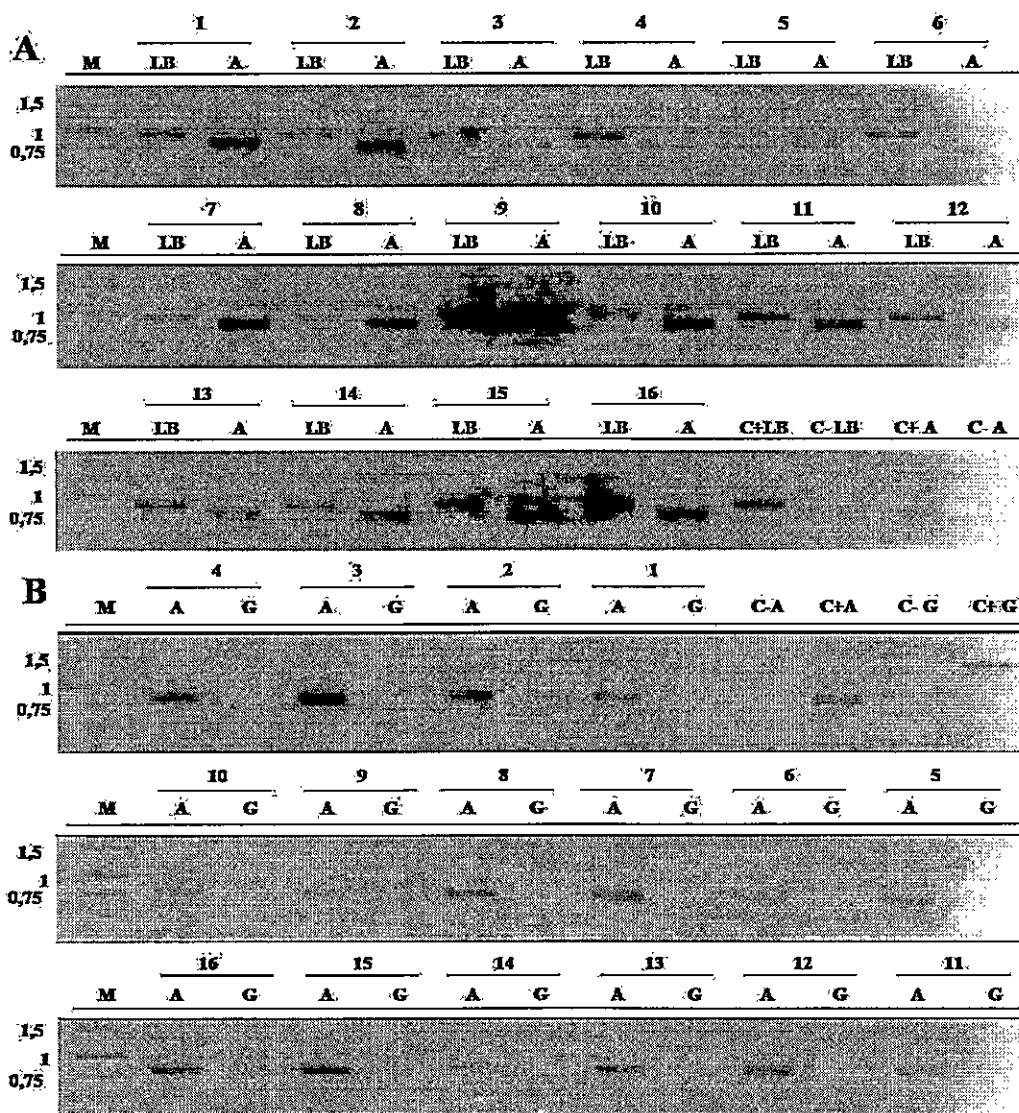


**Figura 10 – Corroboración de la condición de homocigosis en la progenie de las plantas mutantes SALK\_117025.** En geles de agarosa 1% se muestra las bandas amplificadas al utilizar los pares de partidores específicos para determinar la presencia del inserto (carril LB) y su condición en el genoma (carril G) de 10 plantas al azar que son descendientes de la planta parental homocigota 9 SALK\_117025 (ver figura 8). El control de calidad de cada muestra de DNA corresponde a la amplificación del gen de actina (carril A). Para los controles positivos (C+) de G y A se utilizó DNA de planta silvestre; C<sup>+LB</sup>: DNA planta mutante parental 9 SALK\_117025; controles negativos (C-): sin DNA. Los pesos moleculares de los marcadores (M) se indican apropiadamente a los bordes de cada sección (en Kb)



**Figura 11 – Búsqueda e identificación de las mutantes homocigotas SALK\_105485.** Se muestran la electroforesis en geles de agarosa 1% de los fragmentos amplificados por PCR, donde se ocuparon partidores para la determinación de la presencia y ubicación correcta del inserto de T-DNA (carriles LB, en A) y su condición génica mediante la amplificación del fragmento de 1,4 Kb (carril G, en B) en plantas pertenecientes a la línea SALK\_105485, cuyo número sobre cada carril indica la planta analizada. El control de calidad de cada muestra de DNA corresponde a la amplificación del gen de actina (carril A). Se utilizó para los controles positivos (C+) DNA de planta silvestre; C-, control negativo, sin DNA. Los pesos moleculares de los marcadores (M) se indican apropiadamente a los bordes de cada sección (en Kb).





**Figura 12 – Corroboración de la condición de homocigosis en las plantas mutantes SALK\_105485.** En geles de agarosa 1% se muestra los fragmentos amplificados por PCR al utilizar los pares de partidores específicos para determinar la presencia del inserto (carril LB, en A) y su condición en el genoma (carril G, en B) de 16 plantas que son descendientes de la planta parental homocigota 115 (ver figura 10). El control de calidad de cada muestra de DNA corresponde a la amplificación del gen de actina (carril A). Para los controles positivos (C+) de G y A se utilizó DNA de planta silvestre; C+<sub>LB</sub>: DNA planta mutante parental 115 SALK\_105485; controles negativos (C-): sin DNA. Los pesos moleculares de los marcadores (M) se indican apropiadamente a los bordes de cada sección (en Kb).

El estudio del genotipo de las otras tres mutantes seleccionadas también fue realizado. Los resultados fueron resumidos en la tabla VII. Para la línea SALK\_040317 provenientes del banco ABRC, no se encontraron plantas que poseyeran el inserto dentro de la ubicación correcta (tabla VII.A), por lo que no se siguió la búsqueda de plantas que presentaran el inserto de forma homocigota. La línea SALK\_074515 presentó plantas homocigotas en la generación T2 (tabla VII.B).

La línea SALK\_113221 es la única de todas las seleccionadas que presenta el inserto dentro de un exón del locus At2g16530. Se observa la identificación de un heterocigoto en el análisis de las plantas provenientes del banco de mutantes. De ésta se rescató su progenie, de la cual se analizaron 19 plantas, de las cuales ninguna presentaba el inserto de manera homocigota (Tabla VII.B). En la progenie de una planta heterocigota proveniente de la generación T2 nuevamente no se encontró plantas homocigotas para la inserción (tabla VII.C). Esto sugiere que la interrupción del locus At2g16530 en la secuencia codificante en ambos alelos provocaría letalidad en Arabidopsis.

**Tabla VII.A – Resumen de los resultados en la obtención de líneas mutantes insercionales en la generación T1.**

Locus	Línea Mutante (T1)	Homocigotas	Heterocigotas	Sin inserción
At2g16530	SALK_117025	2	0	1
	SALK_040317	0	0	8
	SALK_113221	0	1	6
At5g16010	SALK_105485	4	0	1
	SALK_074515	0	8	4

**Tabla VII.B - Resumen de los resultados en la obtención de líneas mutantes en la generación T2.**

<b>Locus</b>	<b>Línea Mutante (T2)</b>	<b>Homocigotas</b>	<b>Heterocigotas</b>	<b>Sin inserción</b>
At2g16530	SALK_117025	19	0	0
	SALK_113221	0	12	7
At5g16010	SALK_105485	30	0	0
	SALK_074515	12	19	6

**Tabla VII.C - Resumen de los resultados en la obtención de líneas mutantes en la generación T3. Solo la línea SALK\_113221 se analizó en su tercera generación.**

<b>Locus</b>	<b>Línea Mutante (T3)</b>	<b>Homocigotas</b>	<b>Heterocigotas</b>	<b>Sin inserción</b>
At2g16530	SALK_113221	0	10	2

#### **4.3.- Caracterización fenotípica de las plantas mutantes insercionales homocigotas.**

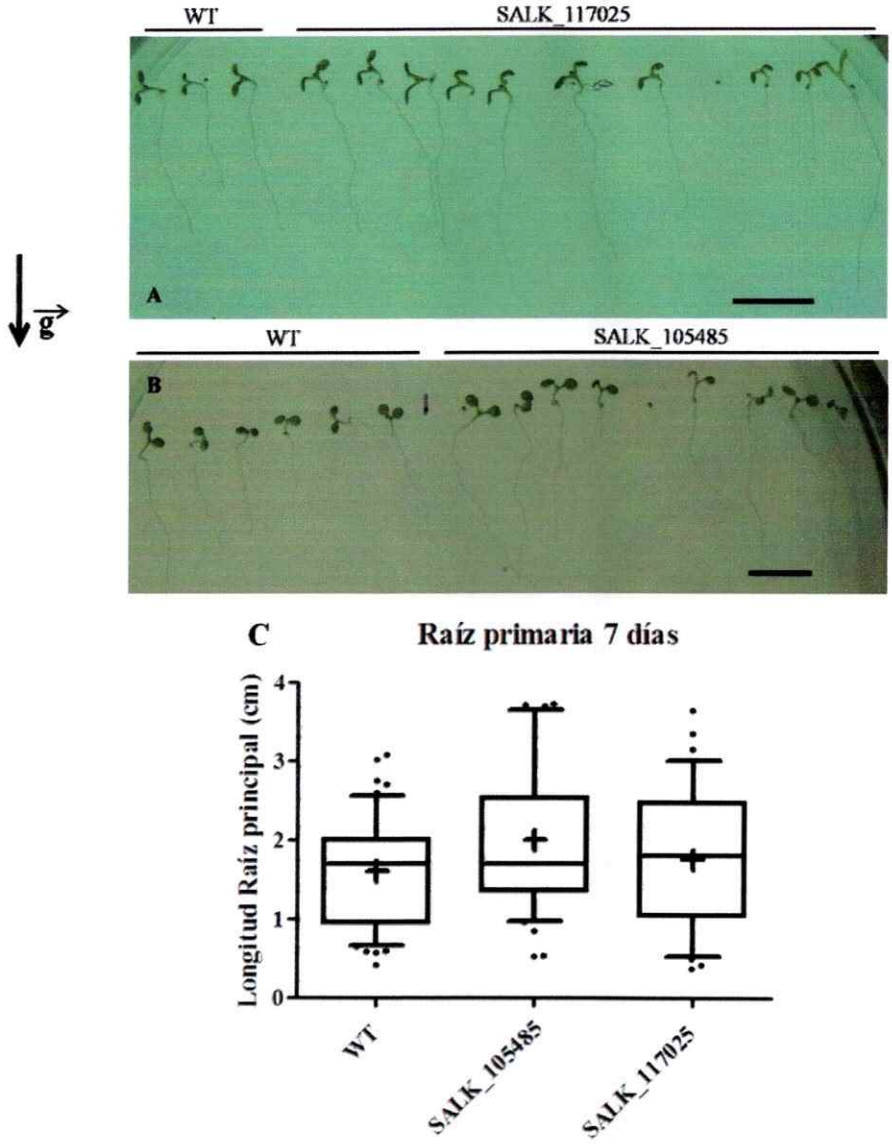
Según la fuente de información de microarreglos disponible públicamente eFP (<http://www.bar.utoronto.ca>), el transcrito de ambos genes ortólogos de DFG10, At2g16530 y At5g16010 se detectó en todos los órganos vegetales analizados. Para determinar si la interrupción de la constitución génica de éstos causa cambios fenotípicos a nivel del organismo, se observó el desarrollo de las plantas silvestres y mutantes, cuantificándose algunos parámetros del desarrollo de la raíz y hojas de roseta. Para esto se estudió el fenotipo de las mutantes de los genes antes mencionados, SALK\_105485 y SALK\_117025 cuyos genotipos son homocigotos para la presencia de la inserción.

En plantas germinadas en medio de cultivo y crecidas por 7 días (figura 13) se observa la presencia de los dos cotiledones abiertos y raíz principal sin desarrollo de raíces laterales, tanto en plantas silvestres como los mutantes homocigotos, sin

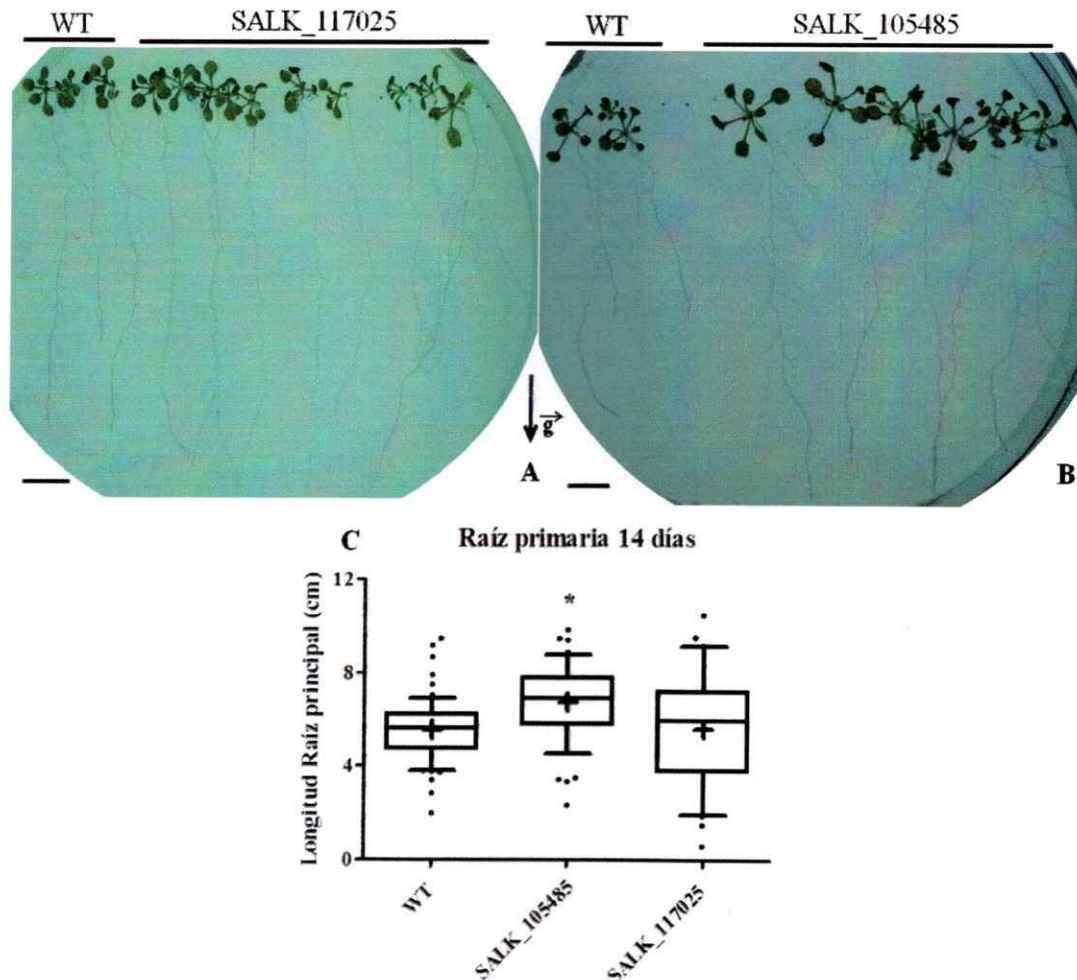
observarse diferencias significativas en el largo de la raíz principal entre ambas (fig. 13.C). Debido a que no se encontraron diferencias, se continuó observando las plantas en cultivo.

En la figura 14 se muestra el fenotipo de las mutantes homocigotas con 14 días después de la germinación en comparación a la línea silvestre. Se observa la presencia de hojas verdaderas y de raíces laterales en ambas líneas. Según el gráfico de cajas se observa una superposición de las poblaciones al medir el largo de la raíz principal, sin embargo al analizar los datos se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en la longitud de la raíz principal de la línea mutante insercional SALK\_105485 que interrumpe el locus At5g16010 (figura 14.B) con respecto a las plantas silvestres. En cambio este mismo análisis no arroja diferencias en el caso de la mutante SALK\_117025 que interrumpe el gen At2g16530 con respecto a la silvestre. Esto muestra que mutaciones en estos dos genes no producen el mismo efecto en el desarrollo de la raíz.

Los resultados mencionados se obtuvieron sembrando las semillas en medio de cultivo sólido para plantas, lo que corresponde a condiciones óptimas de crecimiento en el laboratorio. Sin embargo, sólo permite observar el desarrollo de las plantas hasta 2 semanas de edad por problemas de espacio. Así, se procedió a crecer las plantas utilizando medio hidropónico. En este caso la figura 15 muestra plantas de 35 días en las que se observa la constitución de la estructura foliar de suelo llamada roseta en las plantas silvestres y las mutantes analizadas. Se apreció que esta estructura presentaba más hojas en las plantas mutantes por lo que se procedió a contar el número de hojas de la roseta en cada línea, cuantificación graficada en la figura 16. Según el análisis

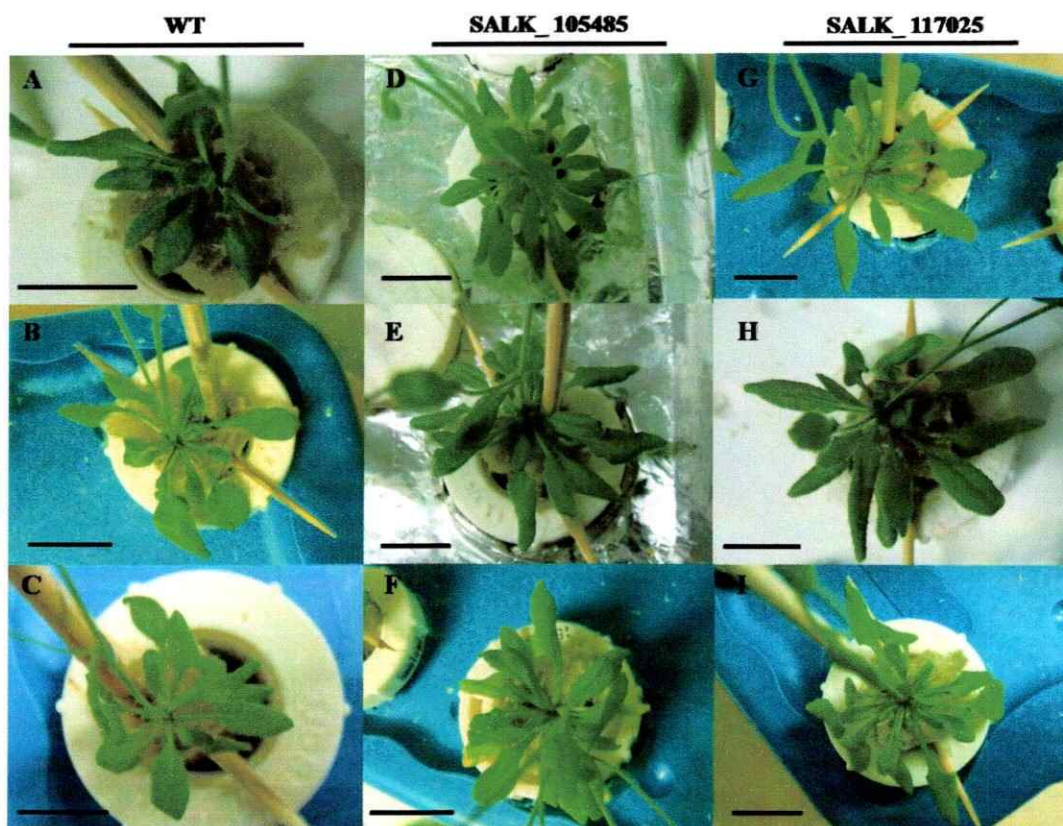


**Figura 13 – Fenotipo en las plantas mutantes homocigotas de 7 días.** Fotos representativas de plantas mutantes del gen At5g16010 (A) como del locus At2g16530 (B) crecidas en medio de cultivo por 7 días. En cada condición se incluyen plantas silvestres (WT) para comparar. No se observan diferencias en cuanto al tamaño y la presencia de órganos. Se cuantificó el largo de la raíz en 55 plantas silvestres, 41 plantas SALK\_105485 y 34 SALK\_117025. Los resultados se grafican en un gráfico de cajas (C) en donde el promedio de cada línea analizada es indicado por el símbolo “+”. La dirección del vector de gravedad es señalado por la flecha **g**. Barra de tamaño: 1 cm



**Figura 14 – Fenotipo observado en las plantas mutantes homocigotas de 14 días.** Se muestran fotos representativas de plantas mutantes del gen At5g16010 (A) y del locus At2g16530 (B) crecidas en medio de cultivo por 14 días. Para comparar en cada condición se incluyen plantas silvestres (WT). En C se expone un diagrama de cajas que muestra la longitud de la raíz principal de 62 plantas silvestres, 48 plantas SALK\_105485 y 31 plantas SALK\_117025. Según análisis post-ANOVA de Bonferroni ( $p < 0,05$ ), hay diferencia estadísticamente significativa entre la mutante SALK\_105485 y el control (indicado por “\*”), pero no entre la línea silvestre y SALK\_117025. Con un “+” se enseña el promedio del parámetro de cada línea analizada. La dirección del vector de gravedad es señalado por la flecha **g**. Barra de tamaño: 1 cm





**Figura 15 – Fenotipo de las hojas de la roseta observado en las plantas mutantes homocigotas de 35 días.** Se presentan en cada columna fotos de tres plantas representativas de cada línea: plantas silvestres (WT; A, B y C), mutantes del locus At2g16530 (SALK\_105485; D, E y F) y mutantes del gen At5g16010 (SALK\_117025; G, H, I). Nótese el aumento en la cantidad de hojas en las condiciones mutantes en comparación al control (WT), analizado en figura 15. Barra de tamaño: 1 cm

estadístico, la línea silvestre se caracteriza por poseer alrededor de 17 hojas por roseta en cambio las mutantes insercionales analizadas, SALK\_105485 posee 24 hojas y SALK\_117025, 21 hojas. Esto es un aumento significativo en la dotación foliar en roseta de las líneas mutantes con respecto a la silvestre. Sin embargo con respecto al tamaño y forma foliar no se registraron diferencias entre ellas. Este resultado es muy interesante ya que mostraría que los genes At2g16530 y At5g16010 tendrían un papel en el desarrollo de la planta, específicamente en la determinación del número de hojas de roseta.

Se observaron las plantas por periodos de tiempo más largos hasta la aparición de flores y semillas. Sin embargo, no se detectaron diferencias en el desarrollo de flores ni de la cápsula seminífera entre las silvestres y las mutantes en los días posteriores, generando ambas semillas viables.



### Cuantificación roseta 35 días

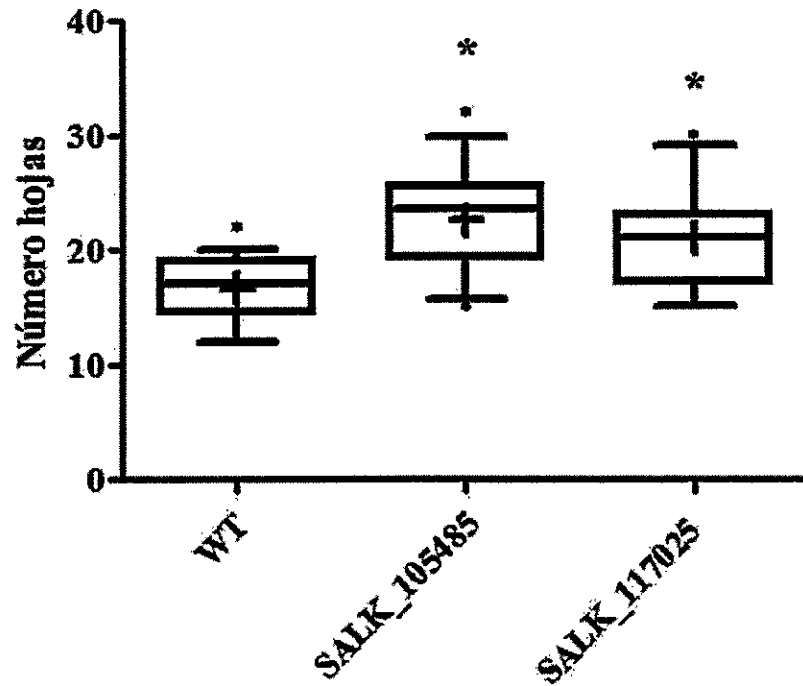


Figura 16 – Cuantificación del número de hojas de la roseta de las plantas mutantes homocigotas de 35 días. En este diagrama de cajas se grafica el número de hojas en roseta de 25 plantas silvestres (WT), 16 plantas SALK\_105485 y 26 plantas SALK\_117025. Según análisis post-ANOVA de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) hay diferencia significativa entre las dos mutantes y la población silvestre, indicado por “\*”. Con un “+” se señala el promedio del parámetro de cada línea analizada.

#### **4.4.- Internalización del marcador fluorescente FM4-64 en las líneas insercionales homocigotas.**

Los productos de los genes estudiados presentan anotaciones que los vinculan al sistema de endomembranas, por lo que su disfuncionalidad podría afectar compartimentos de este sistema o el proceso de la ruta secretoria y la internalización por endocitosis.

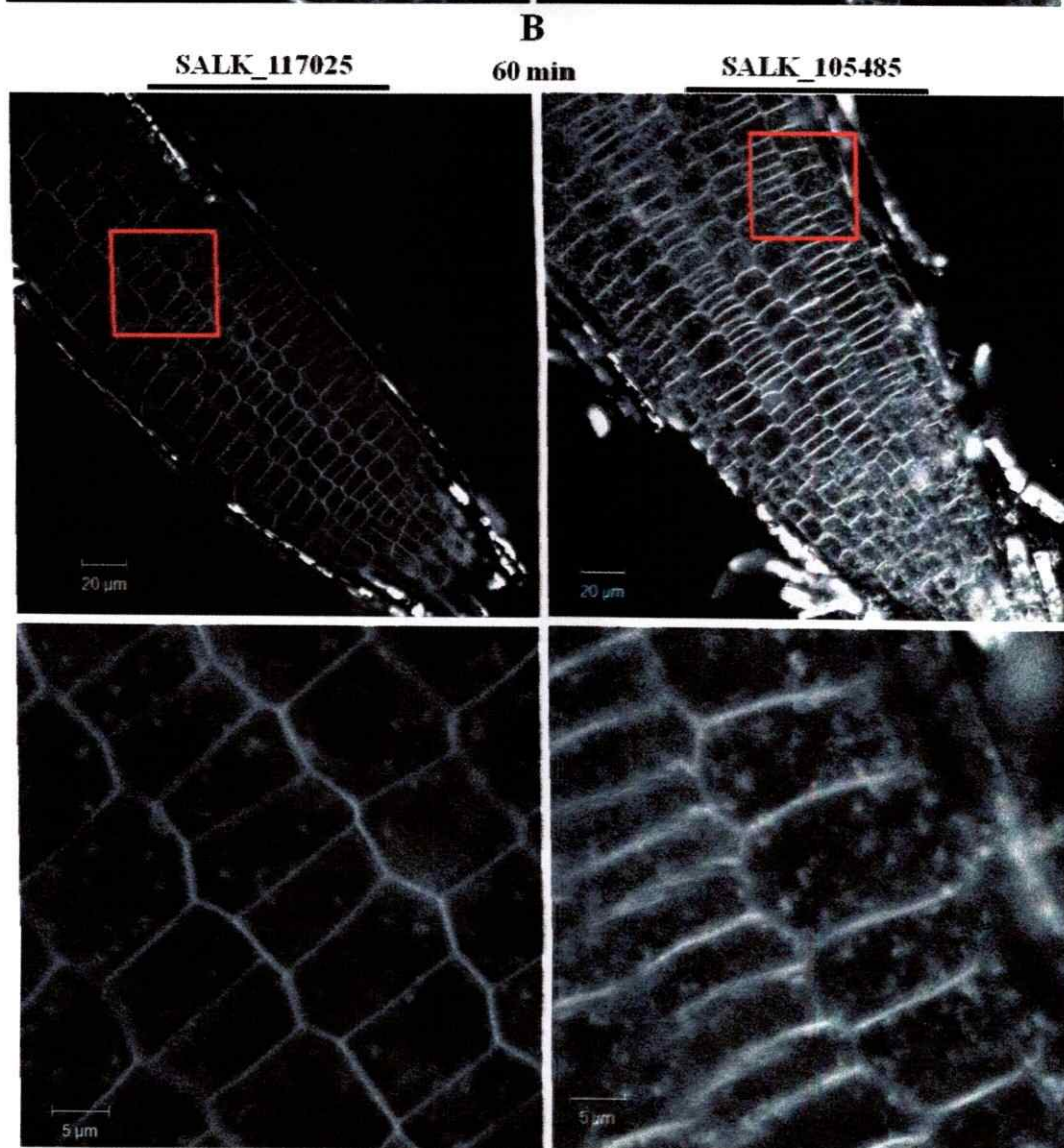
El fluoróforo FM4-64 es un marcador de endocitosis en *Arabidopsis*, que además permite visualizar la estructura de algunos compartimentos del sistema de endomembranas. Al ser liposoluble, se inserta en la membrana plasmática de las células y es internalizado por procesos de endocitosis, marcando a distintos tiempos los compartimentos involucrados en este proceso: endosomas, compartimento prevacuolar y vacuola (Bolte S. y col., 2004). Esto permite estudiar la temporalidad de la endocitosis y caracterizarla con respecto a los compartimentos marcados. Por esto decidimos utilizar esta técnica para estudiar si la interrupción de los genes ortólogos a DFG10 afecta la temporalidad de la endocitosis descrita en plantas silvestres y la morfología de los compartimentos.

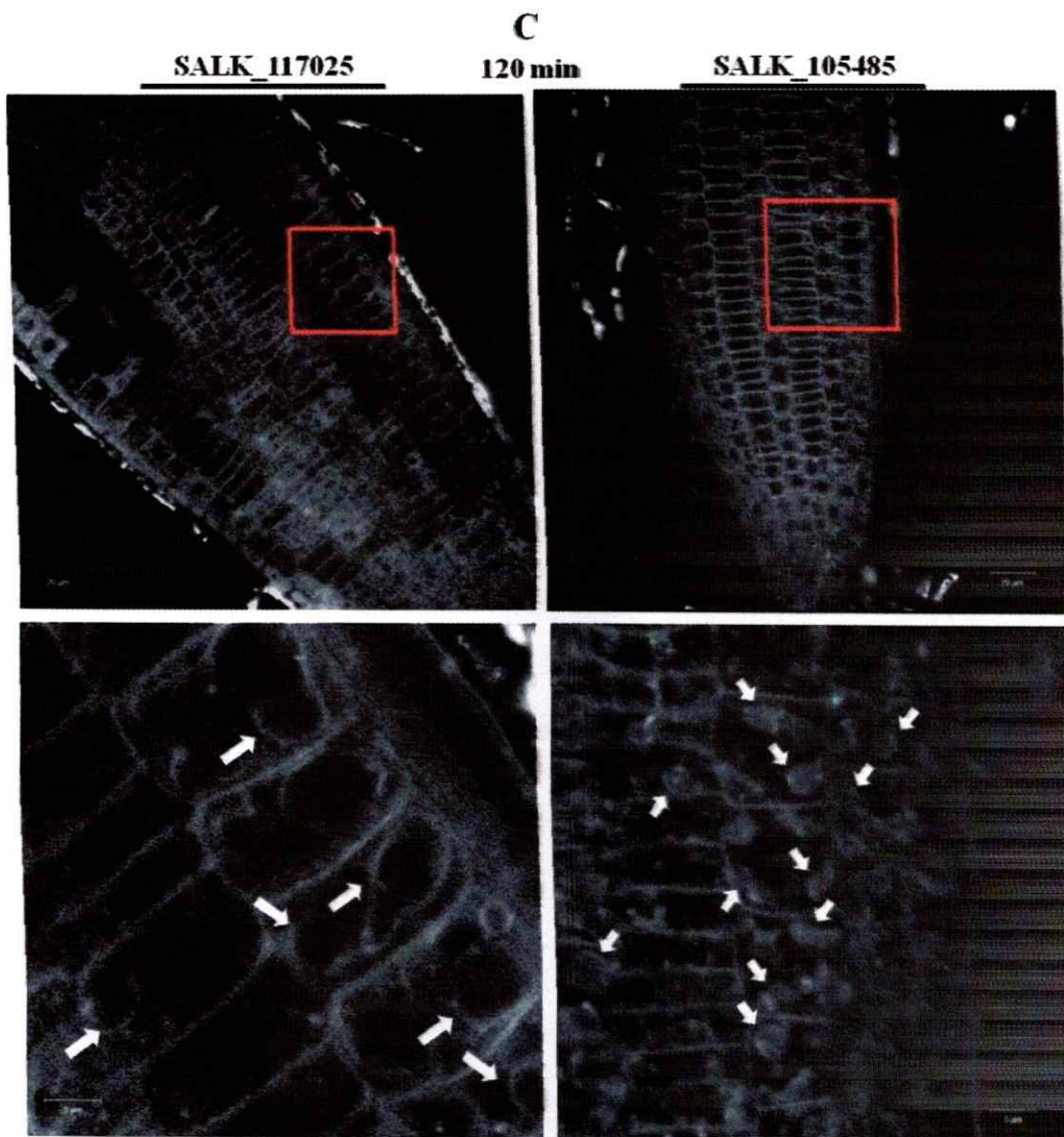
Estudios realizados en nuestro laboratorio han establecido la temporalidad que sigue el proceso de endocitosis en plantas silvestres en nuestras condiciones experimentales. El fluoróforo FM4-64 se une y permanece en la membrana plasmática de las plantas en condiciones de frío (4°C). Para observar el proceso endocítico, las plantas se colocan a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y sin el fluoróforo. Sesenta minutos después del inicio de la incubación a 25°C, la marca se observa en los endosomas, aunque hay fluorescencia en la membrana plasmática. A 120 minutos, la

fluorescencia se observa en la membrana vacuolar, además de los compartimientos establecidos anteriormente. (Pérez P. y Norambuena L.; datos no publicados).

La figura 17 muestra la temporalidad de la internalización de FM4-64 en raíces de mutantes homocigotas SALK\_117025 y SALK\_105485 de 7 días. En las dos mutantes, a 0 minutos del inicio de la incubación a 25°C (figura 17 A) se observa la marca de fluorescencia alrededor de cada célula, por lo que se puede decir que el fluoróforo se encuentra en la membrana plasmática. Sesenta minutos después (figura 17.B), se observa un patrón punteado dentro de las células. Esto es característico de la presencia del fluoróforo en los endosomas. A 120 minutos, la marca es apreciable en la membrana vacuolar en ambas líneas, el cual es señalado con flechas blancas en la figura 17.C. Este curso temporal del FM4-64 es similar a lo registrado para plantas silvestres. Con respecto a la morfología y el tamaño de los diferentes compartimientos involucrados, no se observa alteración aparente en los endosomas. La morfología de la vacuola en la línea mutante SALK\_117025 no se observan cambios aparentes con respecto a las plantas silvestres, sin embargo en la línea mutante SALK\_105485 este compartimiento se ve ligeramente afectado, lo cual se verificará en estudios posteriores.

Con este resultado podemos concluir que la interrupción de los genes At2g16530 y At5g16010 no afecta el proceso endocítico en términos de su temporalidad ni en cuanto a la morfología de los endosomas.





**Figura 17 – Curso temporal de la internalización del fluoróforo FM4-64 en las líneas mutantes SALK\_117025 y SALK\_105485.** Cortes ópticos provenientes de las puntas de las raíces de plantas de 7 días de edad, muestran la ubicación del fluoróforo FM4-64 a 0 minutos (A), 60 minutos (B) y 120 minutos (C). Cada línea mutante es señalada en la parte superior de cada columna de imágenes. Cada sección presenta un plano general y un acercamiento el cual es representado por un cuadrado rojo dentro del corte óptico. Las flechas blancas (en C) indican la presencia del fluoróforo en la membrana vacuolar. Los planos generales presentan un aumento de 400X y los acercamientos, 2000X, excepto la imagen inferior derecha de la sección C la cual presenta un aumento de 1600X. En cada imagen se señala el tamaño de su barra de escala.

## 5.- Discusión

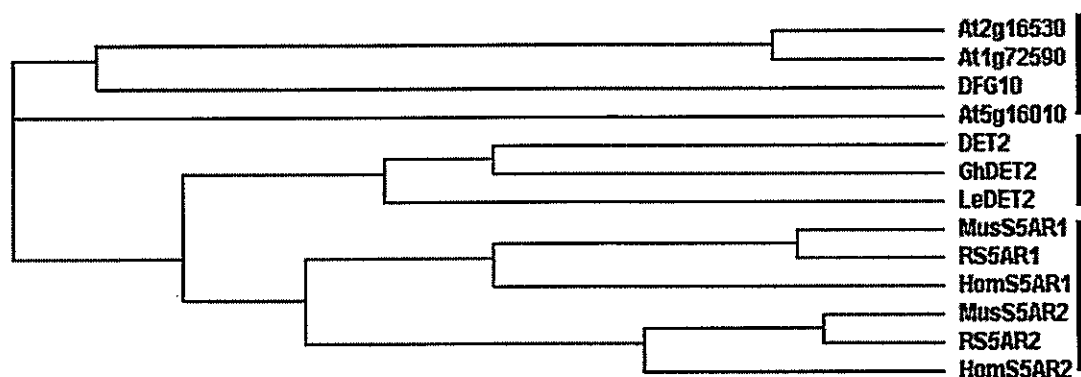
### 5.1.- Ortología de DFG10 en *Arabidopsis thaliana*

La selección de los loci ortólogos de DFG10 en *Arabidopsis thaliana* se basó en la predicción de YOGY, herramienta que integra diferentes predictores bioinformáticos de ortología en complementación con la herramienta BLAST-P que encuentra similitudes a nivel de secuencias proteicas en una amplia variedad de organismos de diferentes reinos. Sin embargo, la falta de evidencia experimental que soporte estas predicciones basadas en conservación de secuencias es crítica, por lo que es necesaria una comprobación experimental. Una de las alternativas que daría cuenta de la actividad de los productos proteicos de los genes ortólogos de *Arabidopsis* sería la complementación del fenotipo mutante resistente a *Sortin2* en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, hay diferentes evidencias entregadas a continuación que en conjunto le brindan una mayor veracidad a la hipótesis de ortología supuesta.

Según PROSITE, las secuencias aminoacídicas de DFG10 y sus ortólogos poseen un dominio esteroide-5- $\alpha$ -reductasa en su extremo carboxilo terminal. Esta actividad ha sido descrita funcionalmente en *Arabidopsis* (Li J. y col., 1996 y 1997) y el gen encargado de esta función se denomina DET2 (At2g38050), que participa en la ruta de biosíntesis de las hormonas vegetales llamadas brasinoesteroides. Estos poseen efectos sinérgicos con otras hormonas como auxinas y citoquininas y que afectan la expansión y división celular, procesos de senescencia, diferenciación vascular y sexual (Clouse S. & Sasse J., 1998). La secuencia aminoacídica de esta enzima puede ser útil para brindar más soporte a la confiabilidad de la hipótesis de ortología a DFG10 en *Arabidopsis* ya que permite relacionar filogenéticamente las secuencias aminoacídicas de DFG10 y sus



ortólogos y contrastarlas con DET2 y secuencias descritas que poseen esta actividad 5- $\alpha$ -esteroide reductasa en otros organismos como el ser humano (*homo sapiens*), rata (*rattus norvergicus*), algodón (*Gossypium hirsutum*), entre otros (Luo M. y col., 2007). En la figura 18 se muestra un cladograma donde se observan claramente 3 grupos: uno agrupa a DFG10 y sus ortólogos en Arabidopsis, dejando fuera a DET2 y sus ortólogos funcionales vegetales los cuales se agrupan en otro clúster y las secuencias de organismos mamíferos en otro grupo. Esto entrega un poco más de confiabilidad a la ortología de DFG10 con las 3 secuencias de Arabidopsis.



**Figura 18 – Relación filogenética entre las secuencias ortólogas de DFG10 (inclusive) y las secuencias ortólogas de DET2 (inclusive).** En este dendrograma se utilizaron secuencias aminoacídicas de *A. thaliana* ortólogas a DFG10 y ortólogas a DET2 (At2g38050) en organismos vegetales como tomate (*Solanum lycopersicum*; LeDET2) y algodón (*Gossypium hirsutum*; GhDET2). Para robustecer el análisis, se utilizaron secuencias de mamíferos las cuales poseen reportes funcionales del dominio 5- $\alpha$ -esteroide reductasa: ratón (*Mus musculus*, MusS5AR), rata (*Rattus norvergicus*; RS5AR) y ser humano (*Homo sapiens*; HomS5AR), cada cual posee dos isoformas 1 y 2, las dos funcionales. Cada barra vertical simboliza el grupo conformado.

También apoyando la hipótesis de ortología, la predicción de TOPPED arroja una posible conservación de la estructura terciaria en el dominio 5-esteroide-reductasa.

Además, en todas las secuencias se presenta una disposición similar en el extremo amino terminal, con un DTM cerca de la posición 15, seguido de un “loop” conformado por aproximadamente 35 aminoácidos y luego otro DTM. Esto indicaría además una conservación de la estructura terciaria en la región amino terminal de las proteínas dentro de genes ortólogos a DFG10.

Con respecto a la localización subcelular, no se conoce dónde se localiza DFG10 pero hay reportes de evidencia directa sobre la ubicación subcelular de uno de sus ortólogos en *Schizosaccharomyces pombe* (YFP9\_SCHPO; O14264; Matsuyama A. y col., 2006). Esta proteína se localiza en el retículo endoplasmático al igual que el producto génico del locus At2g16530 (Tabla VI). Esta evidencia apoya que DFG10 y alguno de los ortólogos en *Arabidopsis* presente una localización similar.

## **5.2.- Determinación de mutantes insercionales homocigotas que interrumpen la región génica de At2g16530 y At5g16010.**

Se obtuvieron mutantes insercionales homocigotas para dos de los tres genes ortólogos en *Arabidopsis thaliana*. Esto fue posible por la corroboración del inserto en las condiciones esperadas en la progenie, producto de la autopolinización de plantas que presentaron el inserto de manera homocigota. Así, se tiene un resultado confiable, ya que por una parte se comprobó la heredabilidad del inserto de T-DNA en la posición y condición génica deseada, lo que brinda confiabilidad y reproducibilidad a los posteriores estudios, en el sentido de que los datos obtenidos utilizando las distintas líneas mutantes efectivamente provienen de plantas mutantes. Por otra parte, se comprobó que la estrategia planteada es eficaz para detectar falsos positivos.



### 5.2.1.- Mutante SALK\_113221

Según el planteamiento de Mendel, en la progenie proveniente de la autopolinización de una planta heterocigota se debería encontrar plantas que presenten homocigosis del elemento estudiado. Sin embargo, las progenies estudiadas de la mutante SALK\_113221 no presentaron este genotipo en la generación T2 ni en la T3. Vale recordar que SALK\_113221 se caracteriza por interrumpir un exón del locus At2g16530, por lo que la ausencia de plantas homocigotas para la inserción, interrumpiendo el marco de lectura abierto del gen, sugiere que esta mutación está causando letalidad en *Arabidopsis*. ¿A qué nivel? La letalidad se puede presentar a nivel del gameto o a nivel de desarrollo embrionario. Ambas generan la imposibilidad de rescatar la condición de homocigocidad, sin embargo es posible discriminar ambos criterios por la proporción del genotipo obtenido en la progenie: si presenta letalidad a nivel del embrión, la proporción de plantas heterocigotas con respecto a las sin inserción será de 2:1, mientras que si existe letalidad gametofítica la proporción heterocigoto: sin inserción será de 1:1, hablando en términos teóricos. La mutante SALK\_113221 presentó una proporción de 1,7 heterocigotos por 1 sin el inserto de T-DNA en la generación T2 y de 5 heterocigotos por una planta sin inserción. Análisis estadísticos (prueba  $\chi^2$  de Pearson;  $p < 0,05$ ) dieron cuenta del rechazo de la proporción 1:1 en la generación T3, característica de letalidad gametofítica, en contraste con la aceptación de la proporción 2:1. Esto sugiere que la inserción en secuencias codificantes del locus At2g16530 provoca letalidad a nivel del embrión y no a nivel de sus gametos. Sin embargo, para asegurar esta afirmación en base a la segregación de los genotipos, se

debe realizar este análisis en una población mucho más abundante, del orden del centenar de plantas como lo expuesto en Neuffer M. & Sheridan W., 1980.

En concordancia con lo expuesto sobre la letalidad, se puede hipotetizar sobre la importancia del producto génico del locus de At2g16530 en el desarrollo del embrión, por lo que se procedió a analizar la presencia de su transcrito en estadios de desarrollo del embrión en *Arabidopsis* mediante la herramienta bioinformática eFP (<http://www.bar.utoronto.ca>). Se reportó que el transcrito del gen At2g16530 presenta una alta expresión en el primordio de raíz en la fase torpedo del desarrollo embrionario, con respecto a las demás partes del embrión en ese estadio, las cuales presentan el transcrito pero a niveles basales. Estas evidencias sugieren una participación del producto génico del locus At2g16530 en el desarrollo del embrión, posiblemente durante la fase torpedo, en la zona donde se encuentra el primordio de la raíz de la planta, por lo que sería interesante caracterizar este locus en el desarrollo del embrión a nivel anatómico y molecular.

### **5.3.- Caracterización fenotípica de las mutantes insercionales homocigotas.**

El fenotipo de un organismo depende fuertemente de variables aleatorias que se trataron de minimizar con procedimientos técnicos como crecer en una misma placa de cultivo tanto plantas silvestres como mutantes y poseer un gran tamaño de muestreo (mayor a diez plantas en cada experimento). Aún así, los experimentos donde se analizan fenotipos morfológicos en plantas presentan una alta variabilidad. Por esto se prefirió, para graficar los resultados, ocupar el diagrama de cajas que muestra la

distribución de toda la población, más que los gráficos de barra que solo muestran un valor representativo de cada población.

Aun tomando en cuenta esta variabilidad intrínseca, se registraron diferencias estadísticamente significativa en la línea SALK\_105485 en comparación con la línea silvestre respecto al desarrollo de la raíz primaria en 14 días de cultivo y en el número de hojas en la roseta en ambas mutantes. También, es importante recalcar la presencia de datos extremos en la condición mutante que no se registraron en plantas silvestres. Esto es patente en la alteración que se produjo en la dotación foliar en roseta donde se cuantificaron en algunas estructuras mutantes más de 30 hojas cuando el máximo en plantas silvestres fue de 23 hojas por roseta. Y viceversa, en líneas mutantes no se cuantificaron rosetas que presentaran menos de 15 hojas, mientras que el 25% de las plantas silvestres analizadas poseen sólo 15 hojas. Esto sugiere que la sola interrupción de estos genes le brinda características distintivas a las líneas mutantes con respecto a la silvestre.

Como se observa un fenotipo diferencial en las líneas mutantes con respecto a las plantas silvestres, se puede hipotetizar una alteración de los niveles de los productos proteicos de los loci estudiados en la planta. Sin embargo es necesaria la cuantificación de esta alteración a nivel de la expresión génica, estableciendo una relación más fidedigna entre el fenotipo diferencial reportado y la alteración en la presencia y abundancia de los transcritos correspondientes en estas líneas mutantes.

Otro punto a considerar es el que se mencionó en el apartado 5.1. Hay reportes que indican la actividad ya caracterizada del dominio 5- $\alpha$ -esteroide-reductasa en plantas, en la proteína DET2. El fenotipo mutante, *det-2*, muestra que estas plantas al crecer en

luz son enanas, mientras que en oscuridad presentan cotiledones abiertos e hipocotilo pequeño con respecto a las plantas silvestres. Tanto el fenotipo de estas plantas en luz como en oscuridad es diferente al que presenta las mutantes insercionales homocigotas (el crecimiento en oscuridad no fue mostrado), por lo que sugiere que DET2 y los ortólogos de DFG10 en *Arabidopsis* cumplen distintas funciones a nivel de organismo y que posiblemente estos ortólogos no participan en la vía de biosíntesis de brasinoesteroides.

Por último, se observa un fenotipo en las líneas mutantes homocigotas insercionales con diferencias significativas respecto a las plantas silvestres, lo que sugiere fuertemente que la interrupción de los genes correspondientes tiene un efecto en el desarrollo de la planta. Sin embargo, se han hecho estudios en que se caracteriza que las mutantes SALK presentan en promedio 1,5 inserciones por planta (Alonso J.M y col, 2003). Así, es posible que exista otra inserción de T-DNA en el genoma de las líneas obtenidas en este seminario, por lo que hay una probabilidad de que el fenotipo registrado se deba a la inserción de T-DNA localizada en otra región del genoma y no a la disrupción del correspondiente locus estudiado. Para comprobar si el fenotipo se debe directamente a la interrupción del elemento génico en cuestión se debe primero realizar *Southern blot* para determinar la existencia de otras inserciones de T-DNA. Si el ensayo de *Southern blot* muestra que hay varias inserciones es necesario realizar un ensayo de complementación del fenotipo introduciendo en el genoma de las líneas mutantes la versión silvestre del locus interrumpido por la inserción y analizar el fenotipo de la planta resultante.

#### **5.4.- Internalización mediada por endocitosis del compuesto fluorescente FM4-64 en las mutantes insercionales homocigotas**

La internalización del fluoróforo FM4-64 permite estudiar el curso temporal del proceso endocítico. Según las predicciones bioinformáticas y anotaciones de localización subcelular, los productos proteicos ortólogos de DFG10 en *Arabidopsis* estarían dentro del sistema de endomembranas y estarían implicados en el metabolismo de lípidos. Se ha reportado que la composición lipídica de las membranas regula diferentes rutas del sistema de endomembranas, en especial endocitosis (van Meer G. & Sprong H., 2004; Moreau P. y col. 2007; Boutté Y & Grebe M, 2009). No obstante, según los resultados no se observó diferencia en el curso temporal de la endocitosis en las líneas mutantes homocigotas, por lo que sugiere que estos genes no son importantes para estos parámetros. La morfología vacuolar en raíces de la línea mutante SALK\_105485 parece ser afectada, sin embargo se necesitará confirmar este fenotipo mediante estos mismos estudios pero manejando un mayor número de plántulas. Por otra parte, los estudios con FM4-64 permiten observar sólo una de las rutas del sistema de endomembranas (la endocitosis), por lo que posiblemente podría verse afectadas otras rutas que pueden ser estudiadas mediante distintos marcadores fluorescentes o con distintos biomoduladores de acción conocida en la alteración en el sistema de endomembranas.

#### **5.5.- Estudios posteriores utilizando el compuesto *Sortin2***

Es interesante la posibilidad de estudiar el fenotipo que estas mutantes presentarían al ser germinadas en distintas concentraciones de *Sortin2*. Como se mencionó en la introducción, la mutante de *Saccharomyces cerevisiae dfg10* presentó

resistencia al compuesto con respecto en la secreción de CPY al medio extracelular; por lo que se esperaría en primera instancia una resistencia fenotípica frente a este compuesto en las mutantes insercionales homocigotas con respecto a las plantas silvestres. El fenómeno de redundancia génica registrado aquí con la identificación de tres ortólogos a DFG10, hace pensar que las mutantes serían sensibles a este compuesto como una gran posibilidad. Esto se podría manejar realizando mutantes dobles homocigotos para ambos genes interrumpidos, At2g16530 y At5g16010.

En plantas silvestres, *Sortin2* causa una alteración del curso temporal de la endocitosis (Perez P & Norambuena L., datos no publicados) por lo que sería interesante estudiar el proceso de endocitosis en mutantes insercionales homocigotas en presencia de *Sortin2*, ya sea en las mutantes únicas o en las dobles.

## 6.- Conclusiones

- Los ortólogos proteicos en *Arabidopsis thaliana* de DFG10 identificados por herramientas bioinformáticas, At1g72590, At2g16530 y At5g16010, presentan características similares en cuanto a su estructura proteica, a la disposición de dominios de transmembrana y a la predicción de dominios funcionales.
- Fue posible obtener líneas mutantes que presentaran el inserto de T-DNA interrumpiendo los genes At2g16530 y At5g16010 de manera homocigota.
- La interrupción del gen At2g16530 en un exón, línea SALK\_113221, se obtuvo solo en condiciones de heterocigosis, aun cuando se analizaron las progenies T2 y T3.
- El fenotipo de las mutantes insercionales homocigotas SALK\_105485 que interrumpen el locus At5g16010, presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al de las plantas silvestres en el largo de las raíces primarias de 14 días de cultivo.
- El fenotipo de las mutantes insercionales homocigotas SALK\_117025 y SALK\_105485 que interrumpen los loci At2g16530 y At5g16010, respectivamente, presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al de las plantas silvestres en el número de hojas de roseta de 35 días de cultivo.
- Las líneas mutantes insercionales no presentaron alteraciones aparentes con respecto al curso temporal del proceso endocítico en comparación al de las plantas silvestres.

## 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.
- Alonso, J., Stepanova, A., Leisse, T., Kim, C., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid M., Weigel, D., Carter, D., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W., Beyy, F 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Sci.* **301**: 653 – 657.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N., Satiat-Jeunemaitre, B. 2004. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microsc.* **214**: 159 – 173
- Boutté, Y. & Grebe, M. 2009. Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr.op.in pl. biol.* **12** : 705 – 713
- Bowers, K. & Stevens T. 2005. Protein transport from the late golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bchim et Bphys acta.* **1744**: 438 – 454
- Cacas, J. 2010. Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system? *Pl., cell & environ.* **1** – 21
- Carter, C., Bednarek, S., Raikhel, N. 2004. Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches. *Curr. Op. in pl. biol.* **7** : 701 – 707
- Clouse, S. & Sasse, J. 1998. Brassinosteroids: regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. pl. physiol. Plant mol. Biol.* **49**: 427 – 451
- Foresti, O. & Denecke, J. 2008. Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic.* **9**: 1599 – 1612
- Gibeaut, D., Hulett, J., Cramer, G., Seemann, J. 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Pl. Physiol.* **115**: 317 – 319
- Haarer, B., Viggiano, S., Hibbs, M., Troyanskaya, O., Amberg, D. 2006. Modeling complex genetic interactions in a simple eukaryotic genome: actin displays a rich spectrum of complex haploinsufficiencies. *Genes & dev.* **21**: 148 – 159
- Hanson, S., Matheson, L., Brandizzi, F. 2006. Seeking a way out: export of proteins from the plant endoplasmic reticulum. *Trends in Pl. Sci.* **11**: 335 – 343



- Jolliffe, N., Craddock, C., Frigerio, L. 2005. Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Bioch. Soc. Transact.* **33**: 1016 – 1018
- Kaschani F. & van der Hoorn R. 2007. Small molecule approaches in plants. *Curr. Op. in Chem. Biol.* **11**: 88 – 98.
- Klyachko, N. 2010. Plant signaling endosomes and endosome trafficking. *Russ. Journal of pl. physiol.* **57**: 290 – 296
- Kwon, Ch., Bednarek, P., Schulze-Lefert, P. 2008. Secretory pathways in plant immune responses. *Pl. physiol.* **147**: 1575 – 1583
- Li, J., Biswas, M., Chao, A., Russell, D., Chory, J. 1997. Conservation of function between mammalian and plant steroid 5 $\alpha$ -reductases. *PNAS.* **94**: 3554 – 3559
- Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T., Chory, J. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Sci.* **272**: 308 – 311
- Luo, M., Xiao, Y., Li, X., Lu, X., Deng, W., Li, D., Hou, L., Hu, M., Li, Y., Pei, Y. 2007. GhDET2, a steroid 5 $\alpha$ -reductase, plays an important role in cotton fiber cell initiation and elongation. *The plant journal.* **51**: 419 – 430
- Moreau, P., Brandizzi, F., Hanton, S., Chatrel, L., Melser, S., Hawes, C., Satiat-Jeunemaitre, B. 2007. The plant ER–Golgi interface: a highly structured and dynamic membrane complex. *The journal of exp. Bot.* **58**: 49 – 64
- Mösch, H. & Fink, G. 1997. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **145**: 671 – 684
- Neberführ, A. 2002. Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, RABs and SNAREs. *Curr. Op. in Pl. Biol.* **5**: 507 – 512
- Neuffer, M., Sheridan, W. 1980. Defective kernel mutants of maize. Genetics and lethality studies. *Genetics.* **95**: 929 – 944
- Norambuena, L., Zouhar, J., Hicks, G., Raikhel, N. 2008. Identification of cellular pathways affected by Sortin2, a synthetic compound that affects protein targeting to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Chem. Biol.* **8**: 1 – 8
- Pérez, P. 2009. Análisis del efecto de Sortin2 en la respuesta a auxinas y en el sistema de endomembranas en *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Richter, S., Voß U., Jürgens G. 2008. Post-Golgi traffic in plants. *Traffic.* **10**: 819 – 828
- Robinson, D., Jiang, L., Schumacher, K. 2008. The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Pl. physiol.* **147**: 1482 – 1492

- Rojo, E., Gillmor C., Kovaleva, V., Somerville, C., Raikhel, N. 2001. VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* **1**: 303 – 310
- Surpin, M. & Raikhel, N. 2004. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat. rev. Mol. Cell biol.* **5**: 100 – 109
- Tian, G., Mohanty, A., Chary, S., Li, S., Paap, B., Drakakaki, G., Kopec, C., Li, J., Ehrhardt, D., Jackson, D., Rhee, S., Raikhel, N., Citovsky, V. 2004. High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta. *Pl. physiol.* **135**: 1 – 14
- Tóth, R. & van der Hoorn, R. 2009. Emerging principles in plant chemicals genetics. *Trends in Pl. Sci.* **15**: 81 – 88.
- Ueda, T., Nakano, A. 2002. Vesicular traffic: an integral part of plant life. *Curr. Op. in pl. biol.* **5**: 513 – 517
- van Meer, G. & Sprong, H. 2004. Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr. Op. in cell biol.* **16**: 373 – 378
- Zouhar, J., Hicks, G., Raikhel, N. 2004. Sorting inhibitors (sortins): chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *PNAS.* **101**: 9497 – 950