

UCH-FC
DOC-BMCN
P695
C.1



“Identificación y estudio funcional de factores de transcripción que regulan la expresión de genes del sistema de endomembrana en *Arabidopsis thaliana*.”

Tesis entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al grado de

Doctora en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias
Facultad De Ciencias

Por

Lorena Pizarro Arcos

Abril, 2015

Director de Tesis: Dra. Lorena Norambuena.

Co-Director de Tesis: Dra. Victoria Guixe.



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Lorena Andrea Pizarro Arcos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día Lunes 13 de Abril del año 2015

Director de Tesis:

Dra. Lorena Norambuena

Co-Director de Tesis:

Dra. Victoria Guixé

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Núñez (Presidente)

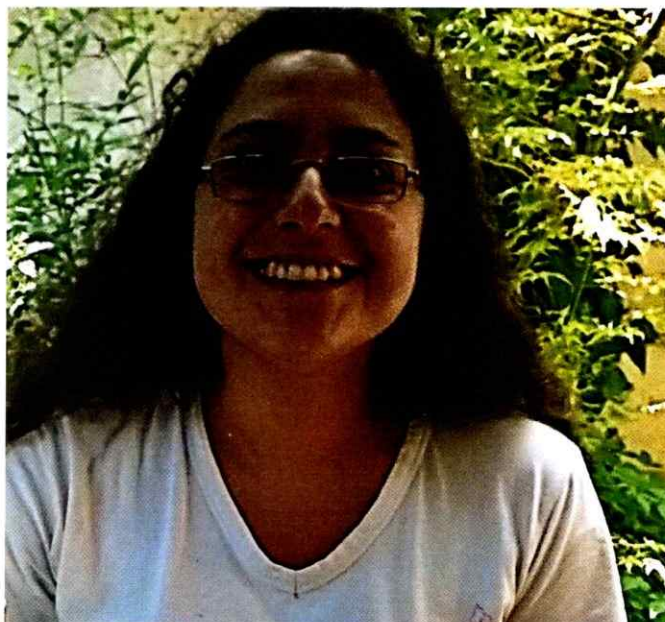
Dr. Francisco Chávez

Dra. Loreto Holuigui

Dra. Verónica Cambiazo



RESUMEN BIOGRÁFICO



Viví y crecí desde que nací el 9 de Junio de 1983 hasta los 17 años en una parcela en la zona de La Cantera, Coquimbo. Mis estudios comenzaron en el Colegio Inglés Católico de La Serena donde cursé toda mi educación básica y media. Aquí descubrí mi pasión por la biología cuando cursaba 1° de enseñanza media. Este gusto por las ciencias y junto con eventos que parecen azarosos, pero que claramente no lo son, me llevaron a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Cuando ya estaba finalizando esta carrera ingresé al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, actual Centro de Biología Molecular Vegetal donde realicé mi tesis de pre-grado y magíster con la Dra Claudia Stange. En este lugar pase grandes momentos, conocí magníficos amigos y comprendí que la investigación era mi vocación y las plantas mi modelo favorito. En base a la aceptación de mi vocación decidí realizar este doctorado que me da las herramientas para continuar haciendo lo que me gusta en algún rincón del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradeceré a mi familia que tienen la paciencia de aceptar la vida y decisiones que toma, esta loca hija, hermana y tía. Gracias por que de ustedes obtuve toda mi formación valorica y emocional que me permitieron estar aca.

Agradezco el apoyo incansable, omnipresente de mis excelentes y maravillosos amigos, que para mí son familia. Sin ellos esta tesis no hubiera comenzado y menos finalizado. Sin ellos esto podría haber sido una historia totalmente distinta, sin todas las alegrías, maravillosos momentos y el aprendizaje inmesurable que trajo consigo. Muchas gracias por todos los papers conversados, las discusiones científicas enriquecedoras. Por todas las conversaciones extensas cuyo fin era buscar una forma de hacer de la ciencia un lugar utopico y del lab un mejor lugar de trabajo. Por esos momento de catarsis en que uno odia todo y lo expresa con pasión. Por entregarme siempre un lugar cálido, un hogar, en cualquier lugar que nos juntaramos. Por todos los cafes, desayunos, episodios de los Simpson, abrazos, conversaciones infinitas por cualquier o todas las plataformas. Por celebrar conmigo cada pequeño triunfo y dejarme celebrar los de ustedes. Por todos los "tecitos" compartidos, esos que alivianan el alma. Por todo esto muchas gracias, les quiero.

Agradezco a todos los profesores de la comisión Dr Marco Tulio Núñez Dr. Marco Tulio Núñez, Dr. Francisco Chávez, Dra. Loreto Holuigui y Dra. Verónica Cambiazo por todos sus comentarios y excelente disposición a la hora de discutir los resultados de esta tesis. Agradezco a la Dra. Victoria Guixé porque siempre ha tenido la puerta abierta de su oficina para mí y con esto ha sido un apoyo para mí como estudiante de este programa así como en el desarrollo de esta tesis. Entrego mis agradecimientos al Centro de Biología Molecular Vegetal (CBMV) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, no solo a los miembros actuales sino a todos esos compañeros y amigos que conocí durante todo el periodo que he pasado en este laboratorio. A todo el trabajo y ayuda aportada por Sebastian, a Angelica y por supuesto a todas las enseñanzas, conocimiento entregado por los profesores del CBMV. Especial mención tiene mi tutor la Dra Norambuena, con quien aprendí mucho en aspectos científico y personal. Definitivamente realizar mi tesis bajo su dirección fue un gran aprendizaje, una experiencia enriquecedora, positiva, una gran elección.

La realización de esta tesis contó con el soporte económico de diversas fuentes dispuestas por la Comisión Nacional de la Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) y de la Universidad de Chile a través de los proyectos FONDECYT-1120289, FONDECYT, FONDEF VIU120036, la beca para doctorados nacionales convocatoria 2009, la beca de apoyo para la realización de tesis (2012-2013), Beca CONICYT para asistencia a eventos cortos y cursos para estudiantes de doctorado convocatoria 2012, Beca para estadía corta en el extranjero de Vice-rectoría de asuntos académicos (Universidad de Chile), Beca MECESUP para estadía internacional (MECESUP UCH0713).

INDICE DE MATERIAS

Dedicatoria	ii
Resumen Biográfico	iii
Agradecimientos	iv
Indice de materias	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de anexos	x
Lista de abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xvii
1. Introducción	1
2. Metodología	18
2.1 Material biológico	18
2.2 Medias de cultivo	20

	2.3 Métodos	22
3. Resultados		42
	3.1 Objetivo específico 1. Caracterización de la Red Regulatoria del Tráfico y selección de los factores de transcripción de interés, mediante análisis de la Red Regulatoria del tráfico.	42
	3.2 Objetivo específico 2. Selección de posibles blancos regulatorios de los factores de transcripción de interés entre los genes de tráfico y estudio de su respuesta frente a compuestos que alteran el sistema de endomembrana.	56
	3.3 Objetivo específico 3. Estudio de la función del/los factores de transcripción seleccionados en la regulación de vías de tráfico y en procesos fisiológicos dependientes de estas vías utilizando genética funcional.	80
	3.4 Objetivo específico 4. Estudio de la de la participación del/os factor/es de transcripción seleccionado/s en la regulación de expresión de genes de tráfico utilizando genética funcional.	110
4. Discusión		146
5. Conclusiones		163
6. Proyecciones		165
7. Bibliografía		168

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Lista de partidores utilizados.	25
Tabla 2: Lista de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados en la Red Transcripcional.	58
Tabla 3: Información de los DEG entre <i>bzip25-2</i> y silvestres obtenidos mediante el análisis transcriptómico.	132
Tabla 4: Información de algunos DEG destacados observados en las condiciones estudiadas en el análisis transcriptómico.	135
Tabla 5: Nivel de mRNA obtenido en el análisis transcriptómico entre la línea <i>bzip25-2</i> y la planta silvestre en la condición control de los genes de tráfico conectados a bZIP25 en la Red Regulatoria del Tráfico.	138
Tabla 6: Información de los DEG entre en tratamiento con BFA y la condición control de la planta silvestre y la línea <i>bzip25-2</i> obtenidos mediante el análisis transcriptómico.	140
Tabla 7: Resumen de las etiquetas Gene Ontology más sobre-representadas entre los DEG de las condiciones analizadas en el análisis transcriptómico.	144

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas de tráfico del sistema de endomembrana.	3
Figura 2. Red Regulatoria del Tráfico.	45
Figura 3. Análisis topológico de la Red Regulatoria del Tráfico.	47
Figura 4. Análisis de la conectividad de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico en la red transcripcional y la red de co-expresión.	51
Figura 5. Respuesta transcripcional de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados a la alteración mediada por drogas que alteran el sistema de endomembrana.	63
Figura 6. Verificación la inhibición del reciclaje endocítico mediado por BFA en células de la raíz de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan PIN2-GFP.	69
Figura 7. Efecto de la inhibición de vías de tráfico mediada por BFA en los niveles de transcrito de los genes de los tráfico seleccionados.	70
Figura 8. Efecto de la inhibición de vías de tráfico mediada por BFA en los niveles de transcrito de los factores de transcripción seleccionados.	73

Figura 9. Verificación la inducción del tráfico desde endosomas a vacuola mediado por Sortin2 en células de la raíz de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan PIN2-GFP.	75
Figura 10. Efecto la inducción del tráfico desde endosomas a vacuola mediado por Sortin2 sobre los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados.	77
Figura 11. Efecto la inducción del tráfico desde endosomas a vacuola mediado por Sortin2 sobre los niveles de transcrito de los factores de transcripción seleccionados.	79
Figura 12. Mutantes insercionales de los factores de transcripción seleccionados utilizados en esta tesis.	81
Figura 13. Análisis de la estructura del retículo endoplasmático de mutantes insercionales de factores de transcripción seleccionados.	84
Figura 14. Análisis de la estructura de la vacuola en mutantes insercionales del factor de transcripción bZIP25.	89
Figura 15. Análisis de la dinámica de internalización de membrana plasmática en células de la raíz de plantas deficientes de bZIP25.	92
Figura 16. Efecto celular de la alteración de vías de tráfico endocíticas mediada por BFA en células de la punta de la raíz de plantas deficientes de bZIP25.	96
Figura 17. Efecto celular de la alteración de vías de tráfico endocíticas mediada por Wm en células de la punta de la raíz de plantas deficientes de bZIP25.	101
Figura 18. Efecto fisiológico de la alteración de vías de tráfico endocíticas mediada por BFA y Wm en líneas mutantes de bZIP25.	104

Figura 19. Efectos de la deficiencia de bZIP25 en la fisiología de la planta: arquitectura de la raíz y resistencia a salinidad.	107
Figura 20. Efecto de la deficiencia de bZIP25 sobre los niveles de transcripto de genes de tráfico.	111
Figura 21. Efecto de BFA sobre los niveles de transcrito de genes de tráfico en la línea deficiente de bZIP25.	106
Figura 22. Efecto de la alteración de vías de tráfico endocítico sobre los niveles de transcrito de <i>bZIP25</i> .	120
Figura 23. Efecto de Wm sobre los niveles de transcrito de genes endocíticos en la línea deficiente de bZIP25.	122
Figura 24. Alineamiento y predicción de dominios de las isoformas de bZIP25.	124
Figura 25. Efecto de la sobre-expresión de la isoforma AT3G54620.1 de bZIP25 en el tráfico endocítico de la membrana plasmática.	127
Figura 26. Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de los genes diferencialmente expresados en las condiciones estudiadas en el análisis transcriptómico global.	131
Figura 27. Modelo de las funciones regulatorias de bZIP25	165

Figura 19. Efectos de la deficiencia de bZIP25 en la fisiología de la planta: arquitectura de la raíz y resistencia a salinidad.	107
Figura 20. Efecto de la deficiencia de bZIP25 sobre los niveles de transcrito de genes de tráfico.	111
Figura 21. Efecto de BFA sobre los niveles de transcrito de genes de tráfico en la línea deficiente de bZIP25.	116
Figura 22. Efecto de la alteración de vías de tráfico endocítico sobre los niveles de transcrito de <i>bZIP25</i> .	120
Figura 23. Efecto de Wm sobre los niveles de transcrito de genes endocíticos en la línea deficiente de bZIP25.	122
Figura 24. Alineamiento y predicción de dominios de las isoformas de bZIP25.	124
Figura 25. Efecto de la sobre-expresión de la isoforma AT3G54620.1 de bZIP25 en el tráfico endocítico de la membrana plasmática.	127
Figura 26. Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de los genes diferencialmente expresados en las condiciones estudiadas en el análisis transcriptómico global.	131
Figura 27. Modelo de las funciones regulatorias de bZIP25	162

LISTA DE ABREVIATURAS

MP	Membrana Plasmática
TGN/EE	Red Trans-Golgi / Endosoma Temprano
MVB/PVC	Cuerpo Multivesicular / Compartimento Prevacuolar
ER	Retículo Endoplásmico
GEF	Factor de intercambio de nucleótido guanina
GAP	GTPase Activating Protein
T _m	Temperatura de fusión
pb	Pares de base
kb	Kilo pares de base
Wm	Wortmanina
BFA	Brefeldina A
RNAseq	Secuenciación masiva de RNA
MS	Murashige & Skoog
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
RT	Transcripción Reversa
LSCM	Microscopía laser confocal

RESUMEN

A través del sistema de endomembrana trafican vesículas cargadas con proteínas y otros componentes celulares, tales como lípidos y azúcares, desde un compartimento a otro. El tráfico de componentes es determinado por una compleja y diversa maquinaria proteica. La regulación del tráfico a través del sistema de endomembranas ha sido clásicamente descrito a nivel post-traducciona. Sin embargo, cada día se reporta más evidencia de la existencia de regulación transcripcional de los genes que codifican para las proteínas de la maquinaria de tráfico, llamados en esta tesis genes de tráfico. Esta regulación transcripcional permitiría modificar los niveles de proteínas de la maquinaria de tráfico y de esta forma aumentar o disminuir el tráfico de componentes, coordinando y modulando el tráfico a través del sistema de endomembranas.

Esta tesis se enfoca en la búsqueda de componentes moleculares que participen en la regulación transcripcional de genes de tráfico utilizando el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*. La búsqueda de estos reguladores transcripcionales se realizó construyendo la Red Regulatoria del Tráfico. El análisis de la red permitió seleccionar siete factores de transcripción como candidatos a regular el sistema de endomembrana, donde uno de ellos corresponde a bZIP28. bZIP28 es un factor de transcripción que ha sido caracterizado como un regulador de la respuesta a estrés de retículo

endoplasmático, indicando la eficacia de la Red Regulatoria del Tráfico para identificar reguladores del sistema de endomembrana, así como los criterios de selección. A través del uso de herramientas farmacológicas se estableció que distintos genes de tráfico cambian sus niveles de transcrito en respuesta a drogas que alteran el tráfico mostrando una dependencia entre la respuesta transcripcional y la vía alterada.

El estudio del rol de los factores de transcripción candidatos en la regulación del funcionamiento del sistema de endomembrana y del tráfico a través de él, se realizó mediante genética reversa. Se observó que la mutante deficiente del factor de transcripción bZIP25 presentó una alteración en la morfología de compartimentos del sistema de endomembrana como el retículo endoplasmático y la vacuola. La dinámica del tráfico endocítico en la mutante deficiente de bZIP25 presentó una mayor tasa de internalización de membrana plasmática y de tráfico a vacuola. Esto se correlacionó con el aumento de los niveles de transcrito de genes CLC2, ARA6 y SYP122, lo cuales codifican para componentes de la maquinaria de tráfico de vías involucradas en endocitosis y tráfico a la vacuola, efecto que es revertido al sobre-expresar a bZIP25 en esta línea mutante. En concordancia con el aumento del tráfico endocítico observado en la mutante deficiente de bZIP25, éste presenta resistencia a drogas que afectan el tráfico a nivel celular y fisiológico. Estos resultados nos permiten concluir que bZIP25 está involucrado en la regulación negativa de la expresión de genes endocíticos y el tráfico a través de vías endocíticas.

Interesantemente, la mutante deficiente de bZIP25 presenta fenotipos fisiológicos asociados a una mayor tasa de endocitosis tales como mayor desarrollo de raíces laterales y resistencia a salinidad. Por otra parte, la mutante deficiente de bZIP25 también presenta alterados los niveles de transcritos de genes de tráfico que codifican

para la maquinaria de tráfico de vías secretorias. Estos resultados sugirien que bZIP25 también tendría un papel en la regulación de la ruta secretoria, actuando como un regulador positivo de ésta.

Mediante análisis RNAseq se determinó que bZIP25 también estaría relacionado con la regulación de la expresión de genes involucrados en el transporte de nitrato, respuesta a estrés y regulación de la señalización de proteínas G. Además, encontramos otros 13 genes de tráfico que tambien serían regulados por bZIP25, lo que refuerza la evidencia de la participación de bZIP25 en la regulación del sistema de endomembrana y del tráfico a través de él.

Con el desarrollo de esta tesis se concluye que la Red Regulatoria del Tráfico y el análisis de ésta permiten identificar factores de transcripción que participan regulando el funcionamiento del sistema de endomembrana. Se identificó y caracterizó a bZIP25 como un regulador negativo de genes endocíticos y de la endocitosis de membrana plasmática y el tráfico a vacuola. Esto constituye la primera evidencia de regulación transcripcional de genes de tráfico con efecto en la dinámica de tráfico a través de vías endocíticas en plantas.

ABSTRACT

Proteins and other cellular components, such as lipids and sugar, traffic in vesicles through the endomembrane system. Trafficking is determined by a complex and diverse protein machinery. Its regulation has been studied mainly at a post-translational level. However, currently has been published more evidence about transcriptional regulation of genes that encode proteins of protein machinery, called hereinafter trafficking genes. The transcriptional regulation would modulate the level of protein machinery of trafficking and therefore increase or decrease the trafficking of components, coordinating the trafficking through the endomembrane system.

This thesis is focused in finding molecular components involved in transcriptional regulation of trafficking genes using the plant model *Arabidopsis thaliana*. The Trafficking Regulatory Network was built to search transcriptional regulators. Seven transcription factors were chosen as candidates to endomembrane system regulation, where one of them is bZIP28. bZIP28 is a transcription factor described as a regulator of endoplasmic reticulum stress, indicating the efficiency of the Trafficking Regulatory Network for identify endomembrane system regulators and the selection criteria for identifying endomembrane system regulators. By means of pharmacological tools were established that different trafficking genes change their transcript level in response to trafficking

perturbations, revealing dependency between the transcriptional response and the trafficking perturbed pathway.

The role of the candidate transcription factors in the endomembrane system regulation and the corresponding trafficking pathway was performed using reverse genetics. The *bZIP25* deficient mutant (*bZIP25.2*) showed an alteration of the morphology of endomembrane system compartments, such as the endoplasmic reticulum and the vacuole. Endocytic trafficking dynamic of *bZIP25* deficient mutant showed a higher rate of plasma membrane internalization and trafficking to vacuole. This result correlates with the increased of *CLC2*, *ARA6* y *SYP122* transcript level. These genes codyfied to components of the trafficking machenary of pathways involved in endocytosis and trafficking to vacuole. This effect is rescued by the *bZIP25.1* over-expression in the mutant background. In accordance to the high endocytic trafficking the *bZIP25.2* is resistant to trafficking disturbing drugs at cellular and physiological level. These evidence that *bZIP25* is involved in a negative regulation of endocytic trafficking genes and trafficking through endocytic pathways.

Interestingly, the *bZIP25.2* deficient mutant showed physiological phenotypes related to a higher endocytosis rate such as higher lateral root development and salt resistance. On the other hand, transcript level of trafficking genes that encode for trafficking machinery of secretory pathways is decreased in the *bZIP25* deficient mutant, suggesting that *bZIP25* would be involved in the regulation of the secretory pathway as a positive regulator.

Transcription profile analysis showed that *bZIP25* would be involved in the regulation of genes related to nitrate transport, aminoacid biosynthesis and G protein signalling regulation. Moreover, this analysis showed that other 13 trafficking genes that

would be regulated by bZIP25, supporting the bZIP25 role in endomembrane system and trafficking regulation.

Overall this thesis showed that The Trafficking Regulatory Network and its analysis allow the identification of transcription factors involved in endomembrane system regulation. It was identified and characterized to bZIP25 as a negative regulator of endocytic genes and consistently endocytosis and trafficking to vacuole cellular processes. This result is the first evidence of a transcriptional regulation of trafficking genes with an effect on endocytic trafficking in Arabidopsis.

1. INTRODUCCIÓN

Aspectos generales del sistema de endomembrana y el tráfico de proteínas

El sistema de endomembranas es un componente fundamental de toda célula eucarionte conformado por un conjunto de compartimentos membranosos interconectados física y funcionalmente por medio de vesículas y túbulos. En una célula eucarionte el sistema de endomembrana cumple funciones fundamentales para la célula, entre las cuales destacan el plegamiento y modificación post-traducciona l de proteínas, así como el transporte, destinación y re-destinación de proteínas a los diversos compartimentos intracelulares (Bonifacino & Glick, 2004; Vitale et al, 1993). Esta última función es altamente relevante pues permite asegurar la correcta localización de proteínas a su compartimento de destino donde la proteína cumple su función o la relocalización de la proteína a otro compartimento en respuesta a determinados estímulos, permitiendo de esta forma la correcta función de las proteínas en el compartimento destino y la respuesta a estímulos a través de la re-localización de proteínas.

En plantas los compartimentos que componen el sistema de endomembrana corresponden a: Membrana Plasmática (MP), Red Trans-Golgi/Endosomas temprano (TGN/EE), Cuerpo Multivesicular/Compartimento Pre-Vacuolar (MVB/PVC), Vacuola, Aparato de Golgi y el Retículo Endoplasmático (ER) (Figura 1). El tráfico de proteínas

a través de estos compartimentos ocurre mediante vesículas y túbulos cargados con proteínas, polisacáridos y lípidos, que son llamadas en general "cargos". Los cargos son transportados en vesículas y túbulos a través de vías de tráfico específicas y altamente reguladas desde un compartimento donante hacia a un compartimento receptor (Bonifacino & Glick, 2004, Viotti et al., 2010). Las vías de tráfico pueden ser agrupadas y clasificadas de acuerdo al origen de la proteína cargo en dos rutas generales: Ruta Secretoria y Ruta Endocítica (Figura 1) (Reyes et al., 2011; Drakakaki & Dandekar, 2013). A través de la ruta secretoria trafican proteínas sintetizadas *de novo* en el retículo endoplasmático las cuales son destinadas hasta el compartimento residente o destino que puede ser cualquier otro compartimento del sistema de endomembrana. Mientras que por la ruta endocítica trafican proteínas provenientes de la membrana plasmática o del espacio extra-celular hacia el TGN/EE desde donde pueden continuar su tráfico a MVB/PVC o la vacuola, incluyendo todas las vías intermedias entre la membrana plasmática y la vacuola. Adicionalmente, la definición de ruta endocítica considerada en esta tesis incluye a todas las vías que permiten el reciclaje de proteínas desde la vacuola o compartimentos intermedios hacia la membrana (Figura 1). Es importante destacar que la mayoría de las vías de destinación a TGN/EE, MVB/PVC y vacuola están compartidas para la ruta secretoria y la ruta endocítica. La distinción entre estas dos vías se realiza en base al origen del cargo. Si el cargo que trafica a su destino fue sintetizado *de novo* corresponde a parte de la ruta secretoria, mientras que si el cargo trafica es re-localizado desde un compartimento residente a otro compartimento es considerado parte de la ruta endocítica. Un ejemplo de proteínas que trafican por la ruta endocítica, como son las proteínas residentes de la membrana plasmática como las proteínas PIN, los cuales son facilitadores del transporte de auxina. Estas proteínas pueden ser

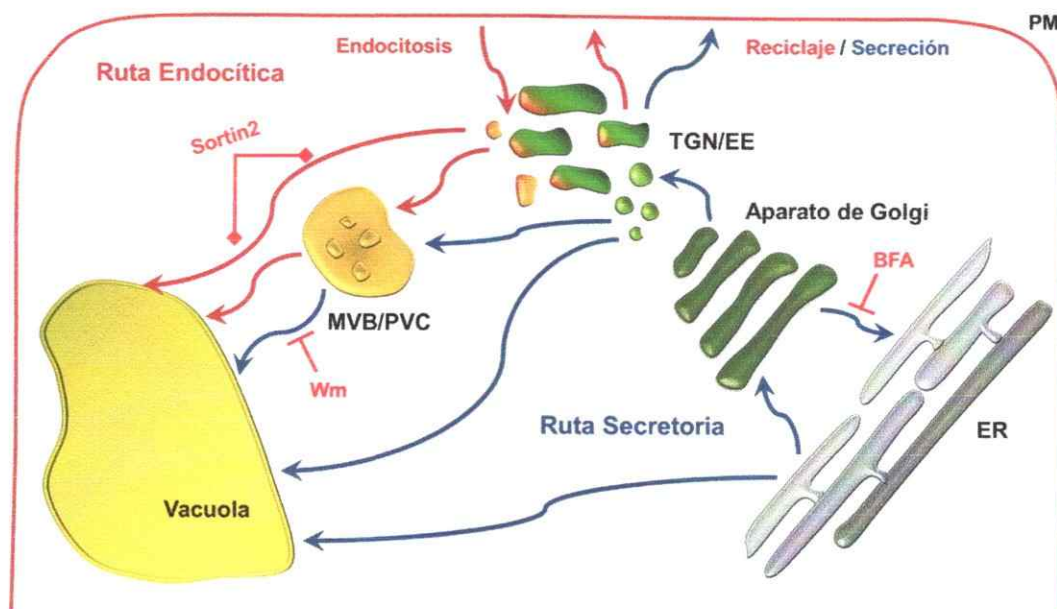


Figura 1. Rutas de tráfico del sistema de endomembrana.

Proteínas, lípidos y polisacáridos son transportados a través del sistema de endomembrana siguiendo vías de tráfico que interconectan los diversos compartimentos de este sistema. En plantas los compartimentos del sistema de endomembrana son: Membrana Plasmática (PM), Red Trans-Golgi/Endosoma temprano (TGN/EE), Cuerpo Multivesicular/Compartimento Pre-Vacuolar (MVB/PVC), Vacuola, Aparato de Golgi y el Retículo Endoplasmático (ER). Las vías de tráfico son clasificadas en la ruta endocítica representadas por flechas rojas y en la ruta secretoria representadas en flechas azules. La ruta endocítica, representada con flechas rojas, incluye a todas las vías de tráfico involucradas en la relocalización de proteínas y otras macromoléculas provenientes del medio extracelular o desde la membrana plasmática a compartimentos intracelulares como TGN/EE, MVB/PVC y la vacuola, así como las vías de reciclaje las cuales están involucradas en el tráfico de vuelta a la membrana plasmática. La ruta secretoria, representada con flechas azules, incluye todas las vías involucradas en el transporte de proteínas sintetizadas *de novo* en el retículo endoplasmático hasta su compartimento residente del sistema de endomembrana o hasta su secreción hacia la pared celular o medio extracelular. La ruta secretoria también incluye el tráfico retrógrado de componentes desde el aparato de Golgi hasta el retículo endoplasmático. En la figura se indican las vías que son alteradas por el inhibidor del reciclaje endocítico y tráfico retrogrado, Brefeldina A (BFA), el inhibidor del tráfico a vacuola, Wortmanina (Wm) y por la droga Sortin2 que acelera el tráfico desde TGN/EE a vacuola.

internalizadas a TGN/EE, desde donde pueden reciclar y volver a la membrana plasmática o bien traficar hacia la vacuola para su degradación a través de MVB/PVC (Kleine-Vehn et al, 2008).

A través del sistema de endomembrana trafican las proteínas de una célula residentes de cualquiera de los compartimentos del sistema de endomembrana, así como las proteínas que son secretadas a la pared celular y al medio extracelular (Vitale et al, 1993). El tráfico de proteínas a través del sistema de endomembrana, y su regulación permite la correcta localización y re-localización de proteínas por lo que está directamente involucrado en diversos procesos fisiológicos como señalización, polaridad celular, respuesta a patógenos, crecimiento del tubo polínico, establecimiento de la arquitectura radicular, transporte de hormonas, entre otros muchos procesos (Surpin & Raikhel, 2004; Frei dit Frey & Robatzek, 2009; Kato et al, 2010; Petrášek & Friml, 2009).

Tráfico vesicular a través del sistema de endomembrana: Mecanismos y componentes

El tráfico vesicular a través de una vía de tráfico, así como su especificidad y eficacia está determinada por una compleja maquinaria proteica compuesta por una gran diversidad de proteínas que participan en la formación y en la recepción de la vesícula que permiten la distribución del cargo (Bonifacino & Glick, 2004). Este conjunto de proteínas que realiza el tráfico de proteínas a través de una vía es denominada la maquinaria de tráfico. En el compartimento donante para la formación de la vesícula participan componentes de la maquinaria que permiten la selección del cargo de la vesícula y la generación de la vesícula propiamente tal (Pucadyil & Schmid,

2009). Por otra parte, los componentes participantes en la recepción de la vesícula en el compartimento destino reconocen y seleccionan las vesículas, a través de interacciones específicas con componentes de la vesícula, y permiten la fusión de la vesículas al compartimento de destino (Woollard & Moore, 2008). Por lo tanto, una vía de tráfico depende de componentes específicos que se encuentran localizados en el compartimento donante, en la vesícula y en el compartimento destino. Existen componentes particulares de cada una de estas estructuras, los cuales a su vez otorgan identidad a los compartimentos y vesículas (Bassham et al., 2008; Vernoud et al., 2003; Pfeffer, 2013). En esta sección describiremos de manera abreviada los mecanismos y maquinaria involucrada en el tráfico vesicular, dando énfasis en los componentes que permiten la regulación de las vías de tráfico en cuanto a su especificidad y dinámica de tráfico.

En el proceso de formación de las vesículas y selección del cargo participan proteínas receptoras de cargo, proteínas de cubierta y GTPasas monoméricas del tipo ARF/SAR1 (Bonifacino & Glick, 2004; Sanderfoot, 2007). La formación de la vesícula es un proceso altamente organizado que requiere la interacción secuencial y jerárquica de los receptores de cargo o el cargo de transmembrana, proteínas ARF/SAR1 y proteínas de cubierta como clatrina, COPII y COPI (Schmid & McMahon, 2007; Gadeyne et al., 2004). Este proceso es un punto clave de la regulación del tráfico en el cual es modulada la actividad de GTPasas monoméricas ARF/SAR1 y el consecuente reclutamiento de otras proteínas de la vesícula. Estas proteínas ciclan de un estado inactivo unido a GDP, usualmente soluble en el citoplasma, a un estado activo unido a GTP, estado en el que la proteína interactúa con la membrana (Pucadyil et al., 2009). El paso del estado activo al inactivo depende del intercambio de GDP por GTP lo que

es mediado por la interacción específica con un factor de intercambio de nucleótido guanina, *Guanine nucleotide Exchange Factor* (GEF) (Pucadyil et al, 2009). El paso de estado inactivo a activo provoca un cambio conformacional que permite la interacción de la GTPasa activada a la membrana y a determinadas proteínas tales como receptores de cargo y proteínas de cubierta, dirigiendo el reclutamiento de proteínas de cubierta (Pucadyil et al., 2009, D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). La activación de la ARF/SAR1 es crucial para establecer la interacción con el receptor de cargo o el cargo de transmembrana y también para dar inicio al reclutamiento de proteínas de cubierta que permiten la formación de la vesícula (Pucadyil et al., 2009, D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). De esta forma las ARF/SAR1 participan tanto en el reconocimiento de los cargos que van empaquetados en la vesícula, así como en la formación de la vesícula propiamente tal. Luego, la GTPasa monomérica es inactivada por la hidrólisis del GTP, en un proceso que es inducido por la interacción con proteínas activadoras de la GTPasa, *GTPase Activating Protein* (GAP). En el estado inactivo cesan las interacciones con la membrana y las proteínas de cubierta, y de esta forma la proteína ARF/SAR1 es liberada y puede empezar otro ciclo de formación de vesículas (Pucadyil et al., 2009, D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006).

Adicionalmente, el receptor de cargo o el cargo transmembrana también tiene un rol en el inicio de la formación de la vesícula pues su dominio citosólico puede sufrir un cambio conformacional que permite la interacción con la proteína ARF/SAR1 activada (Pucadyil et al., 2009, D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). El cambio conformacional del receptor de cargo o de las proteínas transmembrana puede provocarse a través de fosforilación, ubiquitinación o interacción con ligando, por lo tanto es un paso sujeto a regulación post-traduccional que permite la integración de

señales celulares, fisiológicas y ambientales (Scheuring et al., 2012; Urano et al, 2012; Srivastava et al., 2013; Smith et al 2014). En cuanto a las proteínas de cubierta, se requiere de su disponibilidad en la célula para la eficiente formación de la vesícula, de tal forma que bajos niveles de distintas proteínas de cubierta se traduce en una disminuida capacidad de tráfico de la vía en la cual la proteína de cubierta participa (Gadeyne et al., 2014).

Durante la recepción de la vesícula en el compartimento receptor, la vesícula debe ser reconocida para luego fusionarse a la membrana del compartimento de destino. Durante el reconocimiento de la vesícula se establecen interacciones específicas entre GTPasas del tipo Rab y factores de *tethering* (anclaje) (Bonifacino & Glick, 2004; Hong y Lev, 2014). Las proteínas Rab, de manera similar a las proteínas ARF/SAR1, son activadas a través del intercambio de GDP por GTP, proceso que es mediado por su GEF específica (Stenmark, 2009). En este estado su conformación cambia permitiendo el anclaje a la membrana plasmática a través de la exposición de un grupo prenilo (Wollard & Moore, 2008; Stenmark, 2009). En el estado activado, las proteínas Rab interactúan específicamente con factores de *tethering* que están presentes en el compartimento de destino, dando especificidad a la recepción de la vesícula y de esta forma a la vía de tráfico (Hong y Lev, 2014, Stenmark, 2009). La inactivación de la proteína Rab ocurre a través de la hidrólisis del GTP a GDP, lo que conlleva un cambio conformacional que oculta el grupo prenilo de la superficie de la proteína Rab, permitiendo su liberación de la membrana y cesando la interacción con los factores de *tethering* (Stenmark et al., 2009). Esto deja a la Rab libre para comenzar otro ciclo de recepción de una nueva vesícula (Stenmark, 2009).

La fusión de la vesícula al compartimento de destino se realiza a través de la interacción entre los dominios citosólicos de las proteínas integrales de membrana t-SNARE y v-SNARE (Lipka et al., 2007). Las t-SNAREs son proteínas que se localizan en el compartimento de destino, de tal forma que el conjunto de t-SNARE presente en un compartimento determina qué tipo de vesículas puede recibir y fusionar debido a las interacciones específicas que puede establecer con las proteínas v-SNARE de las vesículas (Sanderfoot & Raikhel, 1999; Lipka et al 2007). Además, estas proteínas son característica de un compartimento particular, otorgando identidad al compartimento (Sanderfoot & Raikhel, 1999; Sanderfoot, 2007). Las v-SNAREs se localizan en la vesícula, siendo incorporadas en ella durante el proceso de formación de la vesícula, permitiendo determinar el destino de ésta a través de la interacción de la v-SNARE con las t-SNARE del compartimento de destino (Sanderfoot & Raikhel, 1999; Lipka et al 2007). La interacción de t-SNAREs con la v-SNARE establece un complejo heterooligomérico que provoca un cambio conformacional que acerca la membrana de la vesícula a la membrana del compartimento de destino, provocando la fusión de estas membranas y la liberación del cargo soluble en el lumen del compartimento (Bonifacino & Glick, 2004; Lipka et al 2007). La formación del complejo SNARE es asistido por los factores de tethering, mientras que su desensamblaje es mediado por proteínas ATPasas fusión sensibles a N-etilmaleimida (*ATPase N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*, NSF) y su cofactor la proteína adjunta a NSF (*soluble NSF attachment protein*, SNAP) (Hong & Lev, 2014). De esta forma, las proteínas t-SNAREs quedan disponibles para recibir otra vesícula y la proteína v-SNARE queda disponible para traficar de vuelta al compartimento donante (Bonifacino & Glick, 2004; Lipka et al 2007; Hong & Lev, 2014).

Durante la formación de la vesícula, así como también durante la recepción de ella, participan un gran número de proteínas accesorias involucradas en el establecimiento de interacciones específicas con otros componentes de la maquinaria de tráfico y con la membrana del compartimento de origen y de destino. Destacamos dentro de este grupo de proteínas a las proteínas del tipo EXO70, proteínas de la familia E/ANTH/VHS/GAT y proteínas de la familia emp24/gp25L/p24. Las proteínas del tipo E-ANTH/VHS/GAT participan en la recepción de vesículas como componentes que interactúan de manera específica con el fosfatidilinositol y derivados fosforilados de este fosfolípido que se encuentra presente en las membranas celulares de compartimentos tales como membrana plasmática, membranas del TGN/EE y MBV/PVC.

Estas proteínas participan en la curvatura de la membrana y en la nucleación de las proteínas de cubierta de clatrina (Legendre-Guillemin et al., 2004; Schmid and McMahon, 2007; Song et al., 2012). Por lo tanto, las proteínas del tipo E-ANTH/VHS/GAT participarían en el tráfico mediado por clatrina desde membrana plasmática a compartimentos endosomales, entre compartimentos endosomales y/o a vacuola (Lee et al., 2007; Song et al., 2012). Las proteínas del tipo EXO70 son componentes del complejo multiproteico llamado *Exocyst* el cual participa en el *tethering* y la recepción de vesículas en la membrana plasmática (Chong et al., 2010; Fendrych et al., 2012). De esta forma las proteínas EXO70 participan en la recepción de componentes en la membrana plasmática provenientes de endosomas u otros compartimentos. En este contexto se ha descrito la participación de las proteínas EXO70 en procesos de reciclaje a la membrana plasmática y procesos secretorios como la secreción de componentes de pared celular durante la expansión celular y el

crecimiento del tubo polínico, así como también la secreción de proteínas durante la respuesta a patógenos (Li et al., 2010; Pecenkova et al., 2011). Por otra parte, las proteínas del tipo emp24/gp25L/p24 participan en la formación de vesículas en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi (Gao et al., 2014). Particularmente, estas proteínas participan en el reclutamiento e interacción con proteínas de cubierta del tipo COPII y COPI, de esta forma participan en el tráfico entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Dominguez et al., 1998; Montesinos et al., 2012).

El conjunto de proteínas descritas en esta sección son importantes componentes de la maquinaria de tráfico que pueden estar sujetos a regulación y de esta forma estar modulando el tráfico a través del sistema de endomembrana en una célula. De tal forma que la activación de una vía de tráfico, por aumento de la actividad o disponibilidad de componentes de la maquinaria de tráfico, aumentaría el flujo a través de esta y la inactivación de la vía provocaría la disminución del tráfico a través de ella (Pizarro & Norambuena, 2014). Es por esto que la regulación de la expresión de genes que codifican para componentes de la maquinaria de tráfico, denominados en esta tesis como genes de tráfico, es importante para la modulación del tráfico a través del sistema de endomembrana.

Regulación transcripcional de los genes de tráfico.

El estudio de la modulación del transporte de proteínas a través del sistema de endomembrana se ha enfocado en la regulación a nivel post-traducciona l de componentes de la maquinaria de tráfico de una vía. En este contexto, se ha determinado que la regulación de la actividad e interacción de componentes de la

maquinaria de tráfico de una vía permite la regulación del flujo a través de la vía. Mientras que la localización e interacción específica de los componentes de la maquinaria determina la especificidad y destino de los componentes que trafican por una vía. Adicionalmente, el flujo de componentes a través de una vía de tráfico puede ser modulada a través de la regulación transcripcional de los genes que codifican para los componentes de la maquinaria de tráfico modificando la disponibilidad y abundancia de estos componentes y de esta forma el tráfico (Pizarro & Norambuena, 2014).

En esta tesis proponemos abordar el estudio de la regulación del tráfico de proteínas a través de la regulación de la transcripción de los genes que codifican para los componentes de la maquinaria de tráfico, es decir, los genes de tráfico. Actualmente existe evidencia de regulación transcripcional de los genes de tráfico en diversos procesos fisiológicos y en respuesta a estímulos bióticos y abióticos (Pizarro & Norambuena, 2014). Se ha descrito que en *Arabidopsis thaliana* durante el ciclo celular en el estado G2 se activa la expresión de *KNOLLE*, un gen que codifica para una proteína SNARE de la placa celular, dirigiendo el tráfico de proteínas y otros componentes a la placa celular en formación (Haga et al, 2007; Boutte et al., 2010). *KNOLLE* es co-expresado con la ciclina *CYCB2* siendo ambos regulados por el factor de transcripción *MYB3R4* durante el ciclo celular (Haga et al, 2007). Durante la respuesta a patógenos aumenta la expresión del gen *SNAP33*, el cual codifica a una t-SNARE, así como aumenta la expresión de los genes *VAMP721* y *VAMP722*, los que codifican para proteínas del tipo v-SNAREs (Wick et al, 2003; Collins et al, 2004, Kwon et al, 2007). En respuesta a patógenos también aumentan los niveles de transcrito de los genes *EXO70B1* y *EXO70H1*, los cuales codifican para componentes del complejo

Exocist en *Arabidopsis thaliana* (Pecenková et al, 2011). La inducción de la expresión de estos genes se vincula a la secreción de proteínas *Pathogen Response* (PR) en respuesta al ataque del patógeno (Frei dit Frey & Robatzek, 2009).

Por otra parte, la expresión de las t-SNAREs *SYP122* y *SYP121* de *Arabidopsis thaliana* es inducida en oscuridad y luz, respectivamente, y correlaciona directamente con la interacción con sus respectivos v-SNAREs *VAMP721* y *VAM722* en la membrana plasmática (Kato & Bai, 2010). Esta evidencia indica que la regulación de la expresión de t-SNAREs tiene un efecto en el flujo de la vía de la que participan. Por otra parte se ha descrito que los niveles de transcrito de GTPasas monoméricas del tipo ARF y RAB son modulados durante la maduración de frutos de *Prunus persica*, probablemente para aumentar la secreción de vesículas cargadas de proteínas que modifican la pared celular (Falchi et al, 2010). Adicionalmente, se ha observado que la expresión de genes de tráfico que codifican para SNAREs, GTPasas de tipo RABs y ARF/SAR1 en *Arabidopsis thaliana* puede presentar especificidad de tejido, indicando que existe una regulación transcripcional de ellos y que por lo tanto no presentan necesariamente una expresión constitutiva (Vernoud et al, 2003; Uemura et al, 2004; Richter et al, 2007; Anders & Jürgens, 2008).

Respecto a los reguladores transcripcionales implicados en la regulación del funcionamiento del sistema de endomembranas, se han caracterizado factores de transcripción conservados en levaduras, animales y plantas relacionados con la respuesta al estrés de retículo endoplasmático provocado por la sobrecarga de este con un exceso de proteínas y/o la acumulación de proteínas mal plegadas. Es este proceso se gatilla un sistema coordinado de regulación de la expresión génica para reestablecer la homeostasis (Schröder and Kaufman, 2005; Vitale and Boston, 2008).

Los cambios de expresión en respuesta a este tipo de estrés se puede dividir en dos: el aumento de la expresión de genes involucrados en translocación, plegamiento y degradación de proteínas en el retículo endoplasmático y por otra parte la disminución de la expresión general de proteínas (Schröder and Kaufman, 2005, Urade, 2007). La vía de transducción de esta respuesta es altamente conservada en levaduras y humanos, siendo mediada por receptores homólogos a IRE1, ATF6 y PERK de animales (Ron and Walter, 2007). En plantas se han identificado y verificado la funcionalidad de homólogos para los receptores IRE1 y ATF6: AtIRE1 y bZIP28, respectivamente, así como los cambios de expresión génica característicos de este tipo de estrés, reafirmando la conservación de esta respuesta transcripcional coordinada al estrés de retículo endoplasmático (Urade, 2007, Iwata and Koizumi, 2012). Sin embargo, estos reguladores transcripcionales no han sido descritos como reguladores del tráfico de proteínas, sino como reguladores de la respuesta al estrés de retículo.

En cuanto a la modulación del tráfico a través de la regulación de la expresión de genes de tráfico se ha descrito un ejemplo de regulación coordinada de genes de tráfico ejercida por el factor de transcripción humano TFEB sobre genes que codifican para proteínas involucradas en biogénesis y funcionamiento del lisosoma, en particular en procesos como la degradación de proteínas y exocitosis lisosomal (Sardiello et al, 2009; Settembre et al, 2011; Medina et al, 2011). Interesantemente, este factor fue identificado utilizando una aproximación bioinformática mediante un análisis de sobre-representación de motivos en los promotores de genes que codifican para genes lisosomales que son co-expresados (Sardiello et al, 2009). En este análisis se encontró un motivo altamente representado en los genes lisosomales que esta poco



representado en genes que no están relacionados a procesos lisosomales, llamado *Coordinated Lysosomal Expression and Regulation*, el cual es el sitio de unión del factor de transcripción TFEB (Sardiello et al, 2009).

En plantas se han identificado dos factores de transcripción que regulan a genes de tráfico. Uno de ellos es el factor de transcripción del tipo Cysteine-2/Histidine-2 llamado Regulator of Symbiosome Differentiation (RSD) el cual regula la expresión de *VAM721a* durante el establecimiento del simbiosoma entre *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago truncatula* (Sinharoy et al, 2013). En *Lotus japonicus* la expresión de *VT112* es modulada a través del motivo cis-regulatorio CTTC-P1BS durante el establecimiento simbiote con un hongo, utilizando una maquinaria transcripcional similar a la de los transportadores de fosfato específicos de micorriza (Lota et al, 2013). Si bien cada uno de estos factores de transcripción regula únicamente a un gen de tráfico, este tipo de evidencia abre la pregunta acerca de la existencia de reguladores transcripcionales que modulen el flujo de componentes a través de una vía de tráfico a través de la regulación coordinada de genes de tráfico.

Estrategia de búsqueda de factores de transcripción involucrados en la regulación del tráfico de proteínas.

El tráfico de proteínas es un proceso fundamental para la célula y para la fisiología de la planta, sujeto a una fina regulación de la maquinaria de tráfico que mantiene su función basal y permite cambios en el funcionamiento de ciertas vías en respuesta a determinados estímulos o durante determinados procesos. La relevancia del tráfico de proteínas y su compromiso con diversos procesos biológicos convierte a este modelo en un complejo e interesante modelo de regulación transcripcional cuyos

mecanismos de no han sido dilucidados. Esta tesis propone la búsqueda e identificación de factores de transcripción que regulen el tráfico de proteínas a través de la regulación de la expresión de genes de tráfico en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

La búsqueda de factores de transcripción que participen en la regulación transcripcional se realizó mediante una aproximación basada en la biología de sistemas ya que esta aproximación permite obtener las relaciones subyacentes existentes en sistema complejos a través de la integración de información de diversos tipos de fuentes tales como transcriptómica, genómica, interactómica, entre otros (Gutiérrez et al., 2005). Siguiendo este precepto, en nuestro laboratorio se construyó una red de conectividad la cual hemos denominado "Red Regulatoria del Tráfico". Este trabajo fue realizado junto con el Dr. Alexander Vergara durante su estadía postdoctoral en nuestro laboratorio y la colaboración con el Dr. Rodrigo Gutiérrez (Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile). La Red regulatoria del Tráfico establece conexiones entre factores de transcripción y genes de tráfico integrando información de dos tipos de redes de conectividad, una red transcripcional y una red de co-expresión (Nero et al., 2009). La Red Transcripcional conecta a un factor de transcripción con un gen de tráfico cuando el sitio de unión al DNA del factor de transcripción está sobre-representada en el promotor del gen blanco respecto a la abundancia del sitio de unión en los promotores de los genes del genoma completo de *Arabidopsis thaliana*. La Red de Co-expresión establece una conexión entre un factor de transcripción y un gen de tráfico cuando sus niveles de expresión tienen un índice de correlación de Spearman igual o superior a 0,5. De tal forma que se establece una conexión efectiva entre un factor de transcripción y un gen de tráfico

en la Red Regulatoria del Tráfico cuando ellos están conectados entre sí en ambas redes.

La Red Regulatoria del Tráfico nos entrega un conjunto de factores de transcripción los cuales conectan a los genes de tráfico a través de los dos criterios descritos anteriormente, co-expresión y presencia del sitio de unión al DNA del factor de transcripción, y por esto son considerados candidatos a regular la transcripción de genes de tráfico y de esta forma el flujo a través de la vía de tráfico. Los factores de transcripción que presentan más conexiones en la Red Regulatoria del Tráfico serán estudiados mediante genética funcional para determinar su participación en la regulación del tráfico a través del sistema de endomembranas y en la transcripción de genes de tráfico. De tal forma que si el factor de transcripción está implicado en la regulación de estos procesos la pérdida o ganancia de su función provocaría alteración en el flujo de componentes a través de alguna vía de tráfico y cambios en los niveles de transcrito de genes de tráfico que codifican para componentes de la maquinaria de tráfico de la vía alterada.

Adicionalmente, para determinar si existe una regulación de los genes de tráfico se alterará el funcionamiento de vías de tráfico mediante herramientas farmacológicas. De esta forma determinaremos si genes de tráfico son capaces de responder a nivel transcripcional a la alteración de vías de tráfico y si esta respuesta depende de la función del factor de transcripción en estudio. Esta estrategia nos permitirá identificar a factores de transcripción que regulen el tráfico a través del sistema de endomembranas, en estado estacionario así como en respuesta a la alteración del funcionamiento de la vía de tráfico modulada. En base a esto establecemos la siguiente hipótesis:

Hipótesis:

“Un factor de transcripción que posee una alta conectividad en la Red Regulatoria del Tráfico participa en la regulación del funcionamiento de vías del tráfico a través del sistema de endomembrana y de la expresión de genes de tráfico en respuesta a la alteración del sistema de endomembrana en *Arabidopsis thaliana*.”

Objetivo General:

“Identificación y estudio funcional de un factor de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico que participe en la regulación de la expresión de genes de tráfico y el funcionamiento de vías de tráfico intracelular en *Arabidopsis thaliana*.”

Objetivos Específicos:

Objetivo específico 1: Caracterización de la Red Regulatoria del Tráfico y selección de los factores de transcripción de interés, mediante análisis de la Red Regulatoria del tráfico.

Objetivo específico 2: Selección de posibles blancos regulatorios de los factores de transcripción de interés entre los genes de tráfico y estudio de su respuesta frente a compuestos que alteran el sistema de endomembrana.

Objetivo específico 3: Estudio de la función del/los factores de transcripción seleccionados en la regulación de vías de tráfico y en procesos fisiológicos dependientes de estas vías utilizando genética funcional.

Objetivo específico 4: Estudio de la de la participación del/os factor/es de transcripción seleccionado/s en la regulación de expresión de genes de tráfico utilizando genética funcional.

2. METODOLOGÍA

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

***Escherichia coli* cepa DH5 α**

F-, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*rk*-, *mk*+), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*.

La cepa DH5 α de *Escherichia coli* fue crecida en condiciones de cultivo controlada en un incubador con agitación (2.000 xg) en medio LB a 37°C o en una estufa de incubación a 37°C en medio LB-agar.

***Escherichia coli* cepa DB3.1**

F- *gyrA462* *endA1* *glnV44* Δ (*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsdS20*(*rB*-, *mB*-) *ara14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL20*(*Smr*) *xyl5* Δ *leu* *mtl1*.

La cepa DB3.1 de *Escherichia coli* fue crecida en condiciones de cultivo controlada en un incubador con agitación (2.000 xg) a 37°C en medio de cultivo líquido LB o en una estufa de incubación a 37°C en medio de cultivo sólido LB-agar. Esta cepa es resistente a la proteína codificada por el gen *ccdB* presente en los vectores de la serie pGWB (Nakagawa et al., 2007).

***Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101**

C58, plásmido TI curado, *GenR*, *RifR* (Hellens et al., 2000).

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fueron crecidas en condiciones de cultivo controlada. El cultivo medio líquido se utilizó medio 2YT y la incubación se realizó en un incubador con agitación (2.000 xg) a 28°C. El cultivo en medio sólido fue crecido en medio 2YT-agar e incubado a 28°C en una estufa de incubación.

***Arabidopsis thaliana*.**

La línea silvestre utilizada en esta tesis corresponde al ecotipo Col-0. Las líneas mutantes corresponden a mutantes insercionales obtenidas del banco de semillas ABRC que fueron realizadas utilizando el ecotipo Col-0 (Alonso et al., 2003). Las líneas sobre-expresoras fueron generadas en esta tesis mediante la transformación de plantas silvestres del ecotipo Col-0.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron germinadas placas con medio MS 0,5X - agar, en un incubador con iluminación y temperatura controlada, utilizando fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 24°C constantes. En estas condiciones se mantuvieron las plantas en cultivo hasta que fueron utilizadas para hacer los experimentos desarrollados en esta tesis o hasta que cumplieron 21 días de cultivo. Luego, de los 21 días de cultivo las plantas fueron transferidas a medio hidropónico y cultivadas en invernadero en condiciones de cultivo controlado con horas de luz y 8 de oscuridad a 24°C.

2.2. MEDIOS DE CULTIVO.

Medio LB:

Triptona 1% (Tryptone, Mo-Bio); extracto de levadura 0,5% (Yeast extract, Mo-Bio) y NaCl 0,8% (Merck); pH = 7,0.

Medio LB-agar:

Triptona 1% (Tryptone, Mo-Bio); extracto de levadura 0,5% (Yeast extract, Mo-Bio); NaCl 0,8% (Merck) y 1,6% agar-agar (Merck); pH=7,0.

Medio 2YT:

Triptona 1,6% (Tryptone, Mo-Bio), extracto de levadura 1% (Yeast extract, Mo-Bio) y NaCl 0,5% (Merck), pH = 7,0.

Medio 2YT-agar:

Triptona 1,6% (Tryptone, Mo-Bio), extracto de levadura 1% (Yeast extract, Mo-Bio); NaCl 0,5% (Merck) y agar-agar 1,6% (Merck); pH = 7,0.

Medio MS 0,5X:

Medio MS con vitaminas 0,22% (Murashige & Skoog (MS) médium w/vitamins, Phytotechnology laboratories), sacarosa 2% (Merck), Mio-inositol 0,01% (Myo-inositol, Phytotechnology laboratories) y MES 0,05% (MES, Monohydrate, Phytotechnology laboratories); pH=5,7 ajustado con KOH.

Medio MS 0,5X - agar:

Medio MS con vitaminas 0,22% (Murashige & Skoog (MS) médium w/vitamins, Phytotechnology laboratories), sacarosa 2% (Merck), Mio-inositol 0,01% (Myo-inositol, Phytotechnology laboratories); MES 0,05% (MES, Monohydrate, Phytotechnology laboratories) y Fitoagar 0,7% (Phytoagar, Phytotechnology laboratories). pH=5,7 ajustado con KOH.

Medio Hidropónico 100X

KNO_3 125mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 150mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75mM, KH_2PO_4 50mM, KCl 5mM, H_3BO_3 5mM, MnSO_4 1mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 μM , CuSO_4 150 μM . El pH con todos los componentes anteriores debe ser ajustado a pH=5,0 con KOH. La solución final además contiene $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$ 10mM, Fe/DTPA 10mM; pH=6,0 solución final. Los reactivos utilizados para hacer esta solución son de calidad analítica (Merck). La solución de uso de este medio corresponde a una dilución 1:100, correspondiente a medio hidropónico 1X.

2.3. METODOS

2.3.1 Extracción de DNA genómico de tejido vegetal, método CTAB.

Aproximadamente 100 mg de tejido fueron molidos en un tubo cónico de 1,5 mL utilizando un vástago de plástico, luego se agregó 700 µL de solución CTAB al tubo con el tejido molido y se homogenizó la mezcla con pipeta. Esto fue incubado a 65°C por 30 min en una placa calefactora con agitación. Luego, el tubo con la mezcla fue centrifugado a 13.000 xg por 5 minutos. El sobrenadante (aproximadamente 700 µL) fue transferido a un tubo nuevo al que se le adicionó 700 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión por 5 minutos. Esto fue centrifugado por 5 minutos a 8.000 xg para separar fases. La fase superior que contiene el DNA se transfiere a un nuevo tubo y se repite el lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y centrifugación a 8.000 xg. La fase superior fue traspasada a un nuevo tubo y se le agregó 650 µL de isopropanol lo cual fue mezclado por inversión. Esta solución fue incubada 20 min a -20°C y luego centrifugada a 13.000 xg por 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue lavado con 200 µL de Etanol 70% mezclando en vortex por 15 segundos. Luego esto fue centrifugado por 2 minutos a 13.000 xg, el sobrenadante fue descartado y el sedimento que corresponde al DNA fue secado a temperatura ambiente. Una vez seco el sedimento este fue resuspendido en 100 µL de agua libre de nucleasas (Ultra-Pure DEPC Water Invitrogen).

2.3.2 Extracción de DNA plasmidial.

El DNA plasmidial bacteriano de la bacteria *Escherichia coli* fue extraído utilizando el producto Axygen AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.3.3 Extracción RNA

La extracción de RNA de tejido vegetal se realizó utilizando el producto InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit (Invitek) siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego, de extraído el RNA fue cuantificado utilizando un equipo espectrofotométrico Nanovue (General Electric) el cual también entrega información de la calidad del RNA a través de las razones de la absorbancia 260/280 y 230/280. Adicionalmente la integridad del RNA se determinó mediante una electroforesis denaturante en un gel de agarosa 1,5% en buffer MOPS 1X (MOPS 20mM a pH = 7,0, Acetato de Sodio 8mM, EDTA 1mM a pH = 8,0 y formaldehído 2%) sometido durante 1 hora a 70mV (Anexo 1). El RNA cargado fue denaturado previamente mediante incubación a 70°C por 15 minutos en una dilución 1X del buffer de carga denaturante (Winkler) y teñido con Bromuro de etidio (10 µg/mL). El RNA fue visualizado a través de la exposición del gel en un transiluminador de luz ultravioleta.

2.3.4 Síntesis cDNA

Para la síntesis de cDNA se tomaron 3,5 µg de RNA los que fueron tratados con de DNasa I utilizando las siguientes condiciones: 0,5 unidades de DNasa I (DNase I - RNase Free, Thermo Scientific), 8 unidades de inhibidor de RNase (Ribolock RNase inhibitor, Thermo Scientific), 1X Buffer DNasa I con MgCl₂ (DNase I - RNase Free, Thermo Scientific), en un volumen total de 20 µL. La reacción fue incubada 45 min a

37°C. La reacción fue inactivada por la adición de EDTA a una concentración final de 2,5 mM, seguida de la incubación por 10 min a 65°C. Luego el RNA fue utilizado para la síntesis de cDNA, para esto se utilizaron 1,3 µg del RNA tratado y 1,5 µL de oligo AP de concentración 0,5 µg/mL (Tabla 1, N° 69) los cuales fueron incubados en termociclador a 70°C por 5 minutos y transferidos a hielo por 5 minutos. A esta reacción se adicionó 1,5 unidades de transcriptasa reversa (Improm II Reverse Transcription System, Promega), 8 unidades de inhibidor de RNase (Ribolock RNase inhibitor, Thermo Scientific), Buffer Improm II Reverse Transcription System 1X (Promega), MgCl₂ 6,25 mM, dNTP 0,75 mM. Esta reacción fue incubada a las siguientes temperaturas para realizar la síntesis de cDNA: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 14 minutos a 70°C.

2.3.4 Diseño de partidores

El diseño de partidores específicos para los genes de interés se realizó considerando un largo de partidador entre 18 y 25 bases y un porcentaje de GC entre 40-60 %. Para determinar la especificidad de los partidores se utilizó la herramienta primer blast de sitio NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Además, se analizó la probabilidad de formación de heterodímeros y homodímeros utilizando la herramienta oligoanalyzer del sitio IDT-DNA, con una configuración que considera Mg⁺² 2 mM y dNTP 0.2 mM descartando los partidores que forman dímeros con un ΔG inferior a -7 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Para el caso de los partidores que son utilizados para los experimentos de qPCR se diseñaron partidores con una T_m de 60 +/- 1 °C. Los partidores utilizados en esta tesis están enlistados en la tabla 1.

Tabla 1: Lista de partidores utilizados.

En la tabla se indica el nombre, código de referencia (#), secuencia, locus, gen amplificado, tipo de uso del partidor y temperatura de denaturación (Tm). Los partidores son presentados en pares indicando el tamaño del fragmento a amplificar por el par que incluye un partidor directo 5' y un partidor inverso 3'.

Nombre	Secuencia	Locus	Gen	Uso	Tamaño amplificado (pb)
qRT_AT1G09180_For	AGCTTAGGTATTACTTAGGTCTCA	AT1G09180	SARA1A	qPCR	174 pb
qRT_AT1G09180_R	CAATGCTGCTTGGTTTCCTA				
qRT_AT1G57620_F	CAGTATAATGCTCGCTGGGGA	AT1G57620	EMP24-L2	qPCR	195 pb
qRT_AT1G57620_R	CACTAACAGTTCCAAAGAGAAGATC				
qRT_AT2G46520_F	AGAGCATCCATCATCTTCCACCA	AT2G46520	IMPA-L	qPCR	166 pb
qRT_AT2G46520_R	CATGACCAACAGACATTACGAC				
qRT_AT2G17380_F	ACTCGATGAGCTGTTGATCG	AT2G17380	AP19	qPCR	150 pb
qRT_AT2G17380_R	GACTACTTGGTAGCCTGAGC				
qRT_AT4G32640_F	TCGTATGTGGAGTTTCTCGTG	AT4G32640	SEC23/SEC24-L1	qPCR	125pb
qRT_AT4G32640_R	CAAATCCGAACATGACACAGA				
qRT_AT5G05010_F	TGCCCCAGAACTATCAAGTCA	AT5G05010	CLAT-ADAP-L	qPCR	89 pb
qRT_AT5G05010_R	CGAAATCCAACACCAGATAGT				
qRT_AT5G08080_F	CCTTATTCACGGCTTTGAGTG	AT5G08080	SYP133	qPCR	168 pb
qRT_AT5G08080_R	GAAGTACCTCCTTTAATCCACG				
qRT_AT1G48550_F	GAGAGATTACCGCTGGAAC	AT1G48550	VPS26-L1	qPCR	131pb
qRT_AT1G48550_R	GCTAGGAAGCATACGACTACAA				

qRT_AT1G26690_F	GTTAGATGAACAATAATCCCACCTCT	AT1G26690	EMP24-L1	qPCR	118 pb
qRT_AT1G26690_R	GCAATCGTGTGGATACTTGGATC				
qRT_AT2G36900_F	GCAATCGTGTGGATACTTGGATC	AT2G36900	MEMB11	qPCR	134 pb
qRT_AT2G36900_R	GGCATAAACAACCACTCTGTGCA				
qRT_AT2G40060_F	AAGAATGTTCCCGAAACCAAG	AT2G40060	CLC2	qPCR	90 pb
qRT_AT2G40060_R	TCACACAGATGTAAGCAACGA				
qRT_AT3G07680_F	GCATGCTCGTGTCTAAAAAGTATC	AT3G07680	EMP24-L3	qPCR	117pb
qRT_AT3G07680_R	TCCAATGAACACTACGATCTGTCTG				
qRT_AT3G09740_F	CCCTACGAAAGGACCCATTAG	AT3G09740	SYP71	qPCR	138pb
qRT_AT3G09740_R	CGATGCAGGAAGATAAGACTTG				
qRT_AT3G52400_F	TTGAGGTTCCCTCTGTCTATG	AT3G52400	SYP122	qPCR	143pb
qRT_AT3G52400_R	CAAAGAAATGTGGTGATCGCA				
qRT_AT3G10780_F	TCTACAGAATACGCAAGTGCTA	AT3G10780	EMP24-L4	qPCR	182pb
qRT_AT3G10780_R	TTGAGGAAGTATCGTTTGAGATAC				
qRT_AT5G52000_F	CGATGATATCTACGAGAAAGGCT	AT5G52000	IMPA-8	qPCR	106pb
qRT_AT5G52000_R	CTGAAAGTCCACATCATCACAT				
qRT_AT1G34190_F	CAGTTCGAGTCTCAGGTAGAA	AT1G34190	ANAC017	qPCR	128pb
qRT_AT1G34190_R	GGTCAATAATCCCATGAACACT				
qRT_AT4G35580_F	AGAGAGAGAGAAATCAAATGTAGT	AT4G35580	NTL9	qPCR	133 pb
qRT_AT4G35580_R	CTTGACCATCCGTGTAATTTCA				
qRT_AT3G10800_F	GTAGCCACCTGATTTGAGCTA	AT3G10800	bZIP28	qPCR	163 pb
qRT_AT3G10800_R	GAATCCACTTTATGCTTATCTCAA				
qRT_AT3G54620_F	GTATGACTCAGCGACGGTAA	AT3G54620	bZIP25	qPCR	112 pb

qRT_AT3G54620_R	CTACGACCATTTCACITTCGATT				
qRT_AT4G02590_F	TAGTAGTAGTAGTGGGAAGTTGTG	AT4G02590	UNE12	qPCR	88 pb
qRT_AT4G02590_R	ACAAGGGGTGACAAAATTACAA				
qRT_AT1G03040_F	GTAGGATTTGTGCAGTAAAGAAGT	AT1G03040	AT1G03040	qPCR	142 pb
qRT_AT1G03040_R	CCCTTGGTCCTGAAAATCAC				
qRT_AT5G46760_F	AAGAAGCTAGATGGGATGAGTAG	AT5G46760	MZA15	qPCR	173pb
qRT_AT5G46760_R	GATCTTTCTTCCCGCATTGT				
qRT_AT1G13320_F	GATACITTTGTCGTGTGTTGTCTT	AT1G13320	PP2A	qPCR	111pb
qRT_AT1G13320_R	CAAATACGCCCAACGAACAA				
qRT_AT3G18780_F	GCTTCTCCATTTGTTGTTTCAT	AT3G18780	ACT1NA2	qPCR	105pb
qRT_AT3G18780_R	GGAATAAAGAGGCATCAATTCGA				
SALK_148423_F	TGCTCAGCTATGCTAGTAG	AT3G54620	bZIP25	Genotipificación	1201 pb
SALK_148423_R	ATCTAAGAGACGTACACGAC	AT3G54620			
SALK_119931_F	TGCTCAGCTATGCTAGTAG	AT3G54620	bZIP25	Genotipificación	1201 pb
SALK_119931_R	ATCTAAGAGACGTACACGAC	AT3G54620			
SALK_025104C_for	CTGATACGGCTTCITTTGCTAC	AT1G34180	ANAC016	Genotipificación	1178 pb
SALK_025104C_rev	TGGTTATTCTGTTGTGCTTC				
SALK_022174C_for	CTGGATCTTGTAGTGACGAAG	AT1G34190	ANAC017	Genotipificación	1064 pb
SALK_022174C_rev	GAGAGAAGTAAGTACCCTGAG				
SALK_026937_for	GTTCCATGACGTTTCCATG	AT1G34190	ANAC017	Genotipificación	1130 pb
SALK_026937_rev	ACCAGACAGTCTACTTTGTG				
SALK_065051_for	CAGATTCAGACCTACCGATG	AT4G35580	N7L9	Genotipificación	1081 pb
SALK_065051_rev	AAATATCCCATTTGGTGAGAC				

SALK_010825C_for	GATGTATGTTTGACGCCTG	AT4G02590	UNE12	Genotipificación	1357 pb
SALK_010825C_rev	CAC TTGTTACTGATATGCCTC				
SALK_048028C_for	ACATGGAAGCAGACAGAC	AT5G46760	MZA15	Genotipificación	1205 pb
SALK_048028C_rev	TGGCGTTTAGTGATTGTTTG				
SALK_005407C_for	TCCGTTGGGATTAAGTCTC	AT1G03040	AT1G03040	Genotipificación	1105 pb
SALK_005407C_rev	CATAGCAGCCCTATCTGTC				
SALK_137338C_for	CTCAGAGAATCTCGCTTTTG	AT1G03040	AT1G03040	Genotipificación	1163 pb
SALK_137338C_rev	TCAAACGATGGACAGAG				
qRT_AT4G05320_F	ACCAGCAGCGTCTCATCTT	AT4G05320	UBIQUITINA10	qPCR	127 pb
qRT_AT4G05320_R	GCATAACAGAGACGAGATTTAGAA				
Oligo AP	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTT TTTTTTTTTTTT	--	--	Retro- Transcripción	
RT5G61790-CNX1_F	TCTTCTCGCTCTTCCTCAAG	AT5G61790	CALNEX/INA1	qPCR	104 pb
RT5G61790-CNX1_R	CTCATCCCCACTCTTTGAAC				
AT3G54620CDSRfor	GGCGATTGGGTAAGCGAT	AT3G54620	bZIP25	Clonamiento	1176 pb
AT3G54620.13CDSRev	TTAATGCTTGTGATTCCTCAATGG				
AT3G54620CDSRfor	GGCGATTGGGTAAGCGAT	AT3G54620	bZIP25	Clonamiento	904 pb
AT3G54620.2Rev	CAACCTACAATTGGTAAAAACTT				
qRT_AT1G09080 For	CGAGAAAACCGAGGGAGAGA	AT1G09080	BIP3	qPCR	94 pb
qRT_AT1G09080 Rev	GCTAACCGACTCAAAAGACCTT				
qRT_AT3G54840_For	CATCTCATCTTCAGCCATGTCT	AT3G54840	ARA6	qPCR	162 pb
qRT_AT3G54840_Rev	TGGGTTCCACTTTTGAGGT				
HigroF	TTTGTGTACGCCCGACAGT		Higromicina	Genotipificación	624 pb
HigroR	AAGACCTGCCCTGAAACCGA				

NPT II 5	CAAGATGGATTGCACGCA		<i>Kanamicina</i>	Genotipificación	655 pb
NPT II 3	CTATGTCCTGATAGCGGT				
AtActin4AA89 5'	CACACTTTCTACAATGAGCT	AT2G37620	<i>ACTINA1,</i> <i>ACTINA11</i>	Genotipificación	695 cDNA 850/795 DNA
AtActin4AA320 3'	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT				
LBb1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC	---	---	Genotipificación	
GFP-R	CAGGTAATGGTTGTCTGG	---	<i>GFP</i>	Clonamiento	493 pb
GFP-F	GAGGGTGAAGGTGATGCAAC	---			

2.3.5 Amplificación de DNA por PCR

Las reacciones de PCR para la genotipificación de las plantas así como para la verificación de la calidad del cDNA y la transformación de cepas bacterianas se realizaron utilizando la enzima Paq5000 DNA polymerase (Agilent) utilizando 0,5 μ L de DNA o cDNA, 1 unidad de enzima Paq5000 DNA polymerase, buffer Paq5000 DNA polymerase 1X, dNTP 25 μ M y partidores a 250 nM. El programa de amplificación es el siguiente: denaturación inicial 94°C por 5 minutos en el caso de DNA y 2 minutos para cDNA; ciclos de amplificación 94°C por 1 minuto para el DNA y 30 segundos para cDNA, seguidos de 30 segundos a 56°C y 30-45 segundos de elongación dependiendo del tamaño del amplificado (Paq5000 1kb/30 seg); elongación final de 5 minutos a 72°C. Los partidores utilizados y la secuencia de ellos se encuentran detallada en la tabla 1.

2.3.6 PCR en tiempo real (qPCR)

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se realizaron utilizando el producto Brilliant III ultra-Fast qPCR Master Mix utilizando las siguientes condiciones de reacción: 1X de Master Mix, 100 nM de partidores 5' y 3', 30 nM tinción Rox y 0,5 – 0,1 μ L de cDNA equivalente a 25 – 5 ng de RNA. El programa de PCR utilizado es el siguiente: 2 segundos a 25°C, 3 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Luego se realizó una curva de denaturación desde 60°C a 95°C, que es precedida de 1 minuto de denaturación a 95°C. Para realizar estas reacciones se utilizaron placas de polipropileno 96 pocillos (Agilent), las cuales fueron tapadas con una lámina selladora (ThermalSeal RT, Sigma-Aldrich). Los partidores utilizados se encuentran enlistados en la tabla 1. La cuantificación relativa de los niveles de transcritos fue determinada utilizando la ecuación de Pfaffl (2001), donde la

eficiencia fue calculada usando el programa Linreg (Ramakers et al., 2003). El gen de referencia utilizado en la fórmula de Pfaffl fue seleccionado utilizando el programa Normfinder (Andersen et al., 2004) con el cual se determinó el gen de mantenimiento más estable entre los genes *PP2AC* (AT1G13320), *ACT2* (AT3G18780) y *UBQ10* (AT4G05320).

2.3.7 Electroforesis DNA en geles de agarosa

Las electroforesis de DNA fueron realizadas en geles de agarosa (Lafken) utilizando buffer TAE 1X (Tris 40 mM pH = 7,6, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM a pH = 8,0). La concentración de los geles de agarosa utilizadas fueron de 1,5% para los DNAs de un rango de tamaño de 1 kb a 10 kb y de 2% para los DNAs de un rango de tamaño de 100 pb a 1 kb. Las electroforesis fueron sometidas a voltaje continuo de 80-100 mV. Las electroforesis del producto de qPCR fueron realizadas en buffer TBE 1X (Tris 89 mM pH = 7,6, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM a pH = 8,0) y fueron sometidas a voltaje continuo de 60 mV. La tinción del DNA se realizó después de realizada la electroforesis sumergiendo el gel en una solución acuosa de 0,5 µg/mL de bromuro de etidio durante 30 minutos, luego el DNA fue visualizado exponiéndolo a luz travioleta en un transiluminador acoplado a un sistema de adquisición de imagen (Syngene).

2.3.8 Clonamiento bZIP25 en vector de expresión en plantas

El gen *bZIP25* codifica a tres isoformas de proteínas de acuerdo al modelo génico descrito en la base de datos de *Arabidopsis thaliana* TAIR. Se diseñaron partidores para el clonamiento de las tres isoformas los cuales están presentados en la

tabla 1. El clonamiento de estas isoformas se realizó a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* silvestre de 10 días. La amplificación por PCR se realizó utilizando la Elongase Enzyme (Life-technologies) mediante el siguiente protocolo de amplificación: Denaturación inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de amplificación de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 minutos y 72°C por 1 minuto y 30 segundos; seguidos de 5 minutos de elongación final a 72°C.

El producto de PCR fue clonado en el vector pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, Life-technologies). La verificación de la inserción del producto de PCR se realizó mediante PCR y la determinación de la orientación sentido en el vector fue verificada mediante digestión enzimática con EcoRV (Fermentas), Aval (Fermentas), y la digestión doble Apal/NheI (Fermentas) (Anexo 3). Luego se realizó una recombinación entre los vectores pTOPO-bZIP25 generados y el vector Gateway pGWB5 (Nakagawa et al., 2007) utilizando la enzima LR clonase (Invitrogen). La verificación de la recombinación se realizó mediante PCR direccional utilizando un partidor directo 5' que hibrida en el ATG de bZIP25 (ATG-bZIP25) y un partidor inverso 3' que hibrida en la secuencia del gen que codifica a la proteína GFP (Tabla 1). Este resultado fue verificado mediante digestión enzimática con NcoI (Fermentas), EcoRV (Fermentas) y la digestión doble con NcoI/SpeI (Fermentas) (Anexo 4)

2.3.9 Transformación *Escherichia coli*

Se prepararon células *Escherichia coli* de la cepa DH5 α o DB3.1 competentes con CaCl₂. Para esto se inoculó 50 μ L de cultivo stock de DH5 α o DB3.1 en 3 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación toda la noche (16 horas). Se tomó 750 μ L del cultivo de noche y se inoculó 100 mL de LB, se mantuvo a 37°C con agitación hasta que alcanzó una D.O.₆₀₀ entre 0,4 – 0,5. Luego, se centrifugó a 3.000 xg durante 10

minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió rápida y suavemente en 50 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril y frío. Se centrifugó a 2.000 xg por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril y frío. Se incubó 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 2.000 xg a 4°C y el precipitado se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril y frío, eliminando previamente el sobrenadante. Una vez resuspendidas, las células quedan listas para ser utilizadas o guardadas en glicerol 30% de glicerol a -80°C en alícuotas de 200 µL. Todo el procedimiento se debe realizar manteniendo la esterilidad.

La transformación de *E. coli* se realizó descongelando una alícuota de 200 µL de DH5α competente y se agregó aproximadamente 50 ng del vector de interés. Se mantuvo en hielo por 45 minutos. Luego fue incubado a 42°C durante 1,5 minutos y fueron incubados en hielo por 1 minuto. Se agregó 1 mL de LB y se dejó 1 hora en agitación a 37°C. Luego de este tiempo se plaqueó en LB-agar con el antibiótico adecuado para la selección de las colonias transformadas. Las placas se incubaron a 37°C por toda la noche. Para los vectores derivados de la serie pTOPO (Invitrogen) se usó la cepa DH5α y medio LB suplementado con el antibiótico espectinomicina para su selección (100 µg/mL). La transformación de los los vectores derivados de la serie pGWB se utilizó la cepa DB3.1 y para su selección medio LB suplementado con Kanamicina (100 µg/mL) (Nakagawa et al., 2007).

2.3.10 Transformación *Agrobacterium tumefaciens*

Se prepararon células *Agrobacterium tumefaciens* competentes de la cepa GV3101 en 5 mL de medio 2YT rifampicina 10 mg/L para la selección cromosomal y gentamicina 50 mg/L para seleccionar el plásmido helper. Se incubó a 28°C toda la

noche con agitación. Luego, 4 mL de este pre-inoculo de *Agrobacterium tumefaciens* se inoculo en 100 mL de medio 2YT, con la misma concentración de antibióticos, y se incubó a 28°C con agitación hasta una D.O.₆₀₀ = 0,5. El cultivo fue centrifugado a 3.000 xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado con cuidado y el precipitado fue resuspendido en 1 mL de CaCl₂ 20 mM estéril y frío. Se hicieron alícuotas de 100 µL y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las alícuotas se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* competente se descongeló en hielo una alícuota de 100 µL de células competentes y se agregó 500 ng del vector binario. Luego esta mezcla fue congelada en nitrógeno líquido por 5 minutos y se dejó descongelar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se agregó 1 mL de medio 2YT y se incubó a 28°C toda la noche con agitación. Posteriormente, se plaqueó 50 µL del cultivo en un medio de medio 2YT-agar con antibióticos rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50 mg/L. Para seleccionar el vector binario de la serie pGWB adicionalmente se utilizó kanamicina 100 mg/L y se incubó a 28°C durante 40 horas. Las colonias transformantes se analizaron mediante PCR.

2.3.11 Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas adicionando una solución de esterilización que contiene 80% v/v de etanol absoluto, 20% v/v del producto comercial Clorox (hipoclorito de sodio 37%) y Tween20 0,01% v/v. Las semillas se mantienen en esta solución con agitación por 10 minutos, luego las semillas se dejan decantar y el líquido es eliminado. Luego, las semillas fueron lavadas con etanol 95% cinco veces para eliminar el residuo de la solución de esterilización.

Las semillas fueron secadas en un ambiente estéril utilizando una campana de flujo laminar hasta que queden completamente secas.

2.3.12 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*.

La transformación estable de *Arabidopsis thaliana* se realizó utilizando *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa GV3102, previamente transformada con los vectores de interés, mediante el método de inmersión floral descrito por Zhang et al. (2006). Las semillas progenie T1 de las plantas sometidas al proceso de transformación fueron seleccionadas en medio de selección (MS 0,5X 2% de sacarosa suplementado con antibiótico higromicina a una concentración de 50 µg/mL). Los eventos positivos de transformación son capaces de germinar y crecer en el medio de selección, ya que adquieren resistencia a este antibiótico proveniente de los vectores de la serie pGWB que fueron utilizados en esta tesis (Nakagawa et al., 2007). Las plantas resistentes fueron trasplantadas a cultivo hidropónico para obtener su progenie T2 las cuales fueron germinadas en medio de selección. Las plantas T2 resistentes fueron trasplantadas a hidropónico para que cumplan su desarrollo y obtener su progenie T3. Las plantas T2 resistentes fueron analizadas mediante PCR para verificar la presencia de la inserción y determinar si se encuentra en estado homocigoto o hemicigoto. De esta forma las líneas T2 resistentes homocigotas para la inserción producirán una progenie T3 homocigota para la inserción la cual fue utilizada para otros análisis en esta tesis.

2.3.13 Transformación transitoria de *Arabidopsis thaliana*.

Este sistema de transformación se realizó utilizando como base al protocolo publicado por Marion et al., (2008) el cual fue optimizado siguiendo los pasos que se describen a continuación. *Agrobacterium tumefaciens* previamente transformadas con

el vector de interés pUbi::ER-mCherry o 35S:: δ TIP-GFP fueron crecidas en un pre-inoculo de 4 mL de medio 2YT y posteriormente inoculado en 50 mL medio 2YT hasta una D.O.₆₀₀ de 5,0. Esté cultivo fue sedimentado mediante centrifugación (4.000 g a 4°C) y resuspendido en medio de infiltración el cual contiene 5% sacarosa, 200 μ M acetosiringona (Sigma-Aldrich). Plántulas de 5 días crecidas en medio MS 0,5X – agar fueron co-incubadas con el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* resuspendido en medio de infiltración y se aplicó vacío (10 mm Hg) por un minuto. Este proceso fue repetido 2 veces. El exceso de medio de infiltración fue eliminado y las placas con las plantas fueron puestas en un incubador en condiciones de cultivo controlado (fotoperiodo de 16 horas luz, con temperatura controlada mantenida a 24°C). Tres días después se comprobó la transformación de las plantas utilizando una lupa estereoscópica acoplada a lámparas de fluorescencia, para luego analizar los eventos positivos mediante microscopía confocal (laser scanning confocal microscopy) utilizando un microscopio Zeiss LSM 710.

2.3.14 Tratamiento farmacológico con drogas que alteran el tráfico a través del sistema de endomembrana

Plantas de 10 días de edad fueron tratadas con medio MS 0,5X suplementado con Brefeldina A 50 μ M (BFA, Sigma-Aldrich), Wortmanina 33 μ M (Wm, Sigma-Aldrich) y Sortin2 50 μ g/mL. Para cada tratamiento se realizó un tratamiento control en el cual se agregó un volumen equivalente de solvente, correspondiente a Etanol para el tratamiento con BFA y DMSO para el tratamiento con Wm y Sortin2. Para los ensayos de determinación de los niveles de transcrito los tratamientos con BFA fueron realizados por 3, 5 y 10 horas según, los tratamientos con Wm fueron realizados por 3 horas y los tratamientos con Sortin2 por 3 y 6 horas. En los ensayos de internalización

de la membrana plasmática en el tratamiento con BFA y Wm, la incubación con los fármacos comenzó en la incubación en frío con el trazador FM4-64. Luego de la tinción con este trazador se continuó la incubación con las drogas a temperatura ambiente y fueron realizadas las mediciones del ensayo de internalización de la membrana plasmática en el tiempo en condición control y en el tratamiento con BFA y Wm.

2.3.15 Dinámica de endocitosis del trazador de membrana plasmática FM4-64

La marcaje de la membrana plasmática con el trazador FM4-64 (Invitrogen) se realiza utilizando una concentración final de este trazador de 5 μM en un volumen final de 3 mL de medio MS 0,5X frío (4°C aproximados). En esta solución se incuban en frío y oscuridad por 15 minutos entre 6-8 plantas de *Arabidopsis thaliana* de 10 días del genotipo de interés. Luego las plantas fueron lavadas con medio MS 0,5X para sacar el exceso de FM4-64. Estas plantas son montadas sobre el portaobjeto con medio MS 0,5X y cubiertas con cubre objeto para realizar las mediciones mediante microscopía confocal (LSCM) utilizando un microscopio LSM 510. Utilizando la siguiente configuración para la adquisición de imagen: longitud de onda de excitación de 543 nm y recolección de fluorescencia en el rango de 560 y 650 nm.

2.3.16 Visualización del marcador fluorescente GFP y mCherry mediante microscopía confocal

Estas plantas son montadas sobre el portaobjeto con medio MS 0,5X y cubiertas con cubre objeto para realizar las mediciones mediante microscopía confocal (LSCM) en un microscopio Zeiss LSM 510 para el caso de PIN2-GFP y un microscopio Zeiss LSM 710 para los marcadores $\delta\text{TIP-GFP}$ y KDEL-mCherry. La detección de la proteína PIN2-GFP en el microscopio Zeiss LSM 510 se realizó utilizando el objetivo

40X marca Zeiss y la siguiente configuración de láser para excitación del fluoróforo y recolección de la emisión: longitud de onda de excitación de 488 y filtros de recolección de fluorescencia de 505-530. La detección de las proteínas δ TIP-GFP y KDEL-mCherry en el microscopio Zeiss LSM 710 se realizó utilizando un objetivo 40X con la siguiente configuración para la excitación del fluoróforo y recolección de la fluorescencia emitida: para la detección de δ TIP-GFP la planta fue excitada a 488 nm y la emisión fue recolectada a 492-570, mientras que para la detección de KDEL-mCherry la planta fue excitada a 561 y la emisión recolectada a 588-696 nm.

2.3.17 Análisis transcriptómico global

El análisis transcriptómico global se realizó en colaboración con el Dr Glenn Hicks del Institute for Integrative Genome Biology, Universidad de California, Riverside. Para la generación de las librerías de secuenciación se realizó una purificación para enriquecer la población de RNA poliA utilizando el producto NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module. La calidad y concentración del RNA fue analizada utilizando un equipo Bioanalyzer 2100. Con este RNA poliA se generaron librerías enriquecidas en fragmento de insertos de 250 pb utilizando en producto NEBNext ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs Inc). Cada librería generada fue marcada con el sistema de código de barras de partidores del producto NEBNext Multiplex oligos for Illumina (New England Biolab Inc). Para diversos pasos de la purificación del RNA de poliA así como en la generación de la librería se utilizaron las perlas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). La calidad, concentración y el

tamaño de los fragmentos de la librería fue determinado utilizando el equipo Bioanalyzer 2100.

La secuenciación de las librerías fue realizada utilizando la tecnología Illumina HiSeq2500 HT en la Universidad de California, Riverside. Se realizó una secuenciación en modo "pair end" de 101 pb obteniendo en promedio 80.000.000 lecturas por línea, correspondiente a 4 librerías. El análisis de los datos obtenidos de la secuenciación masiva fueron realizados en Bioinformatic Facility, Institute for Integrative Genome Biology, Universidad de California, Riverside. La metodología utilizada fue la siguiente:

- 1) Recorte o "trimming" de los adaptadores desde las lecturas usando Trimmomatic (Bolger et al., 2014).
- 2) Alineamiento de las lecturas a la base de datos TAIR10 utilizando Tophat2 (Kim et al., 2013).
- 3) Obtención de una tabla de lecturas que se sobreponen con las regiones exónicas del genoma de *Arabidopsis thaliana* usando la base de datos TAIR10 y sistema R, lo cual fue realizado por Ruobai Sun del Bioinformatic Facility, Institute for Integrative Genome Biology, Universidad de California, Riverside.
- 4) Identificación de genes diferencialmente expresados (DEG) fue realizada con el paquete edgeR de bioconductor (Robinson et al., 2010).
- 5) Análisis de sobre-representación de etiquetas de DEG mediante la herramienta FUNCAT del Institute of Bioinformatic and System Biology of HelmholtzZentrum München, Germany (Mewes et al., 2008, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>).

2.3.18 Análisis de la Red Regulatoria del Tráfico

El análisis de la Red Regulatoria del Tráfico se realizó utilizando el programa Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>), el cual permite hacer el análisis topológico presentado en esta tesis mediante el plugin Network analysis usando la configuración

que el programa asigna por defecto (Shannon et al., 2003). La esquematización de la red fue realizada utilizando el programa Cytoscape.

2.3.18 Análisis de experimentos de microarreglos.

El análisis de los experimentos de microarreglos se realizó utilizando los datos no editados de los experimentos realizados en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con MG132, tunicamicina, AZC, IAA y PNO8. Los experimentos analizados fueron obtenidos de la base de datos NASC's International Affymetrix Service (<http://affymetrix.arabidopsis.info/>) y corresponden a los siguientes: 1) Tratamiento con MG132 y control (NRID8041_RIKEN-GODA1A9.CEL, NRID8042_RIKEN-GODA1B9.CEL, NRID8043_RIKEN-GODA22A9.CEL y NRID8044_RIKEN-GODA22B9.CEL); 2) Tratamiento con tunicamicina y control (GSM297841.CEL, GSM297833.CEL, GSM297839.CEL, GSM297827.CEL y GSM297843.CEL); 3) Tratamiento con AZC y control (GSM297824.CEL, GSM297825.CEL, GSM297830.CEL, GSM297831.CEL, GSM297836.CEL y GSM297837.CEL); 4) Tratamiento con IAA y control (GSM25858.CEL, GSM25859.CEL, GSM25860.CEL, GSM25861.CEL, GSM25862.CEL, GSM25863.CEL, GSM25864.CEL, GSM25865.CEL, GSM25866.CEL, GSM25867.CEL, GSM25868.CEL, GSM25869.CEL, GSM25870.CEL, GSM25871.CEL, GSM25872.CEL, GSM25873.CEL, GSM25874.CEL, GSM25875.CEL, GSM25876.CEL, GSM25877.CEL y GSM25878.CEL); 5) Tratamiento con PNO8 y control (NRID8045_RIKEN-GODA15A5.CEL, NRID8046_RIKEN-GODA15B5.CEL, NRID8047_RIKEN-GODA16A5.CEL, NRID8048_RIKEN-GODA16B5.CEL, NRID8049_RIKEN-GODA1A5.CEL, NRID8050_RIKEN-GODA1B5.CEL, NRID8051_RIKEN-GODA28A5.CEL, NRID8052_RIKEN-GODA28B5.CEL, NRID8053_RIKEN-

GODA29A5.CEL, NRID8054_RIKEN-GODA29B5.CEL, NRID8055_RIKEN-GODA2A5.CEL, NRID8056_RIKEN-GODA2B5.CEL). Además se utilizó un experimento de microarreglo no publicado de la Dra. Norambuena realizado en plantas tratadas con la droga Sortin1. Estos datos fueron normalizados y analizados utilizando el algoritmo x-rma del paquete de bioconductor (www.bioconductor.com) para obtener los genes diferencialmente expresados en cada condición respecto a su correspondiente control. Se consideraron cambios significativos cuando el *p-value* fue menor a 0.05 y se detectó la presencia de transcrito en todas las réplicas de los experimentos.

3. RESULTADOS

3.1 Objetivo específico 1.

Caracterización de la Red Regulatoria del Tráfico y selección de los factores de transcripción de interés, mediante análisis de la Red Regulatoria del tráfico.

Para abordar la búsqueda de factores de transcripción que regulan el sistema de endomembrana utilizamos una red de interacción entre factores de transcripción y genes de tráfico que llamamos Red Regulatoria del Tráfico. La construcción de la Red Regulatoria fue realizada por el Dr Alexander Vergara durante su estadía post-doctoral en nuestro laboratorio a través de una colaboración con el Dr. Rodrigo A. Gutiérrez. Esta colaboración nos permitió contar con la vasta experiencia que el Dr. Rodrigo A. Gutiérrez del Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile poseen en el área de la biología de sistemas, así como también tener acceso a bases de datos construidas en su laboratorio y a una base de datos de los sitios de unión de los factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* perteneciente al laboratorio de la Dra. Gloria Coruzzi del Department of Biology, New York University. Utilizando esta información el Dr. Alexander Vergara generó la Red Regulatoria del Tráfico la cual establece conexiones entre genes de tráfico provenientes de la etiqueta de Gene

Ontology GO:0006886 *Intracellular protein transport* y los factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana*.

La Red Regulatoria del Tráfico integra dos criterios de interacción que han sido utilizados previamente en forma exitosa para la predicción de mecanismos regulatorios transcripcionales (Nero et al., 2009). El primer criterio es la co-expresión entre genes de tráfico (GO:0006886) y los factores de transcripción anotados para *Arabidopsis thaliana*. La co-expresión fue determinada en base al índice de correlación de Spermann, con un valor de corte de 0,5, entre los factores de transcripción y genes de tráfico utilizando 1107 chips de microarreglos disponibles en la base de datos NASC (Nero et al., 2009). El segundo criterio utilizado fue la sobre-representación de los sitios de unión de los factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* en los promotores de los genes de tráfico. El valor de corte para la sobre-representación fue 3 veces la desviación estándar del promedio de aparición del sitio en cada promotor de los genes de *Arabidopsis thaliana* (Nero et al., 2009). Utilizado estos dos criterios fue construida la Red Regulatoria del Tráfico que conecta a los factores de transcripción y a los genes de tráfico cuando se cumplen estos dos criterios. Cada uno de estos criterios establece a su vez conexiones entre factores de transcripción y genes de tráfico, permitiendo generar dos subredes las que son denominadas Red Transcripcional y Red de Co-expresión. La intersección de ambas permite generar la Red Regulatoria del Tráfico. Para la construcción de la red se utilizó un universo de 133 genes de tráfico (GO:0006886) y 906 factores de transcripción de *Arabidopsi thaliana*. De este universo de componentes utilizados para construir la Red Regulatoria del Tráfico un total de 31 genes de tráfico y 91 factores de transcripción cumplen con los criterios de construcción estableciendo un total de 125 conexiones (Figura 2).

El análisis topológico de la Red Regulatoria del Tráfico nos muestra que esta red tiene un número promedio de vecinos de 2,049 y un diámetro de 9 nodos. Adicionalmente, se determinó la ley de poder de distribución de grado la cual es un parámetro propio de las redes de conectividad y se define como el número de nodos promedio que tiene cada grado. La ley de poder permite clasificar la topología de la red, en términos de si la red es de tipo "random/al azar" o "scale free/escala libre" (Barabasi & Oltvai, 2004, Albert, 2005). En las redes de topología random la ley de poder de distribución de grado en función del grado se ajusta a una curva con distribución de Poisson, mientras que la mayoría de las redes biológicas presentan una topología de escala libre, donde la ley de poder de la distribución de grado en función del grado se ajusta a una ecuación del tipo $D(k) \sim \alpha k^b$. Las redes biológicas de diversos tipos tienden a poseer una ley de poder de escala libre (Barabasi, 2009). En concordancia con esto, nuestra Red Regulatoria del Tráfico presenta una ley de poder de distribución de grado igual a $Y = 7,996 X^{-0,712}$ que se ajusta a la ecuación del tipo $D(k) \sim \alpha k^b$, por lo cual esta red corresponde a una red de escala libre (Figura 3A). Esto nos indica que, como es esperado, la Red Regulatoria del Tráfico es una red de tipo escala libre lo que es característico de redes biológicas (Barabasi and Oltvai, 2004, Albert, 2005).

Para la interpretación de redes de conectividad es importante la identificación de los nodos altamente conectados y de los nodos centrales de la red, puesto que se ha descrito que tanto los nodos altamente conectados como los nodos centrales de una red son claves en el sistema que la red representa (Barabasi and Oltvai, 2004). Para la identificación de los nodos altamente conectados se utiliza parámetros

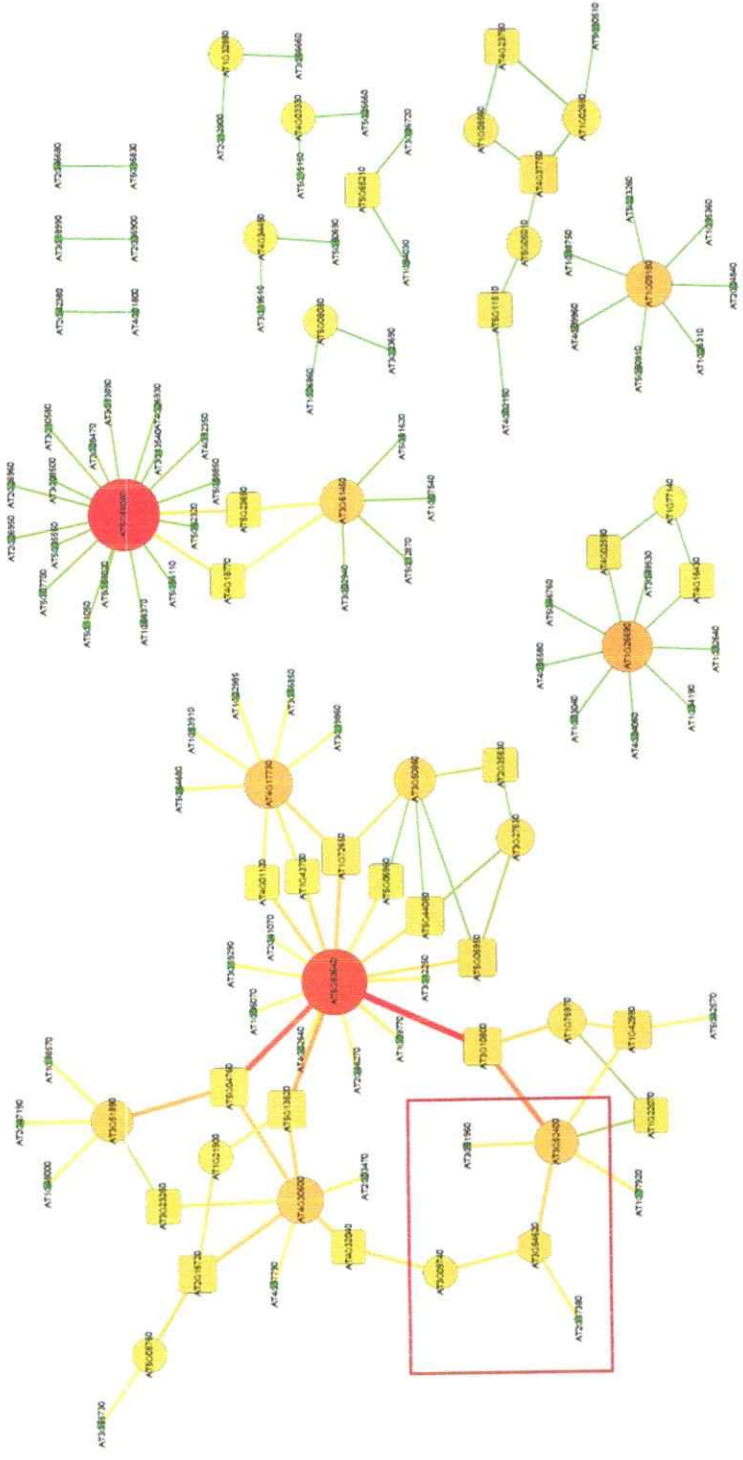


Figura 2: Red Regulatoria del Tráfico.

Esquema de la Red Regulatoria del Tráfico compuesta de 91 factores de transcripción y 31 genes de tráfico de *Arabidopsis thaliana*. En círculos se grafican los genes de tráfico y con cuadrados los factores de transcripción. El tamaño y el color de los nodos están asignados según el grado de conectividad, utilizando una escala creciente de tamaño y colorométrica (verde a rojo). El espesor y color de las interacciones está asignado según el valor de *betweenness* utilizando una escala creciente de tamaño y colorométrica (verde a rojo). Resultado en un rectángulo se muestra con un hexágono el factor de transcripción bZIP25 (AT3G54620) y los genes de tráfico conectados a este factor de transcripción.

como el "grado de conectividad" y para determinar los nodos centrales se utiliza el "coeficiente de *betweenness*". El grado de conectividad de un nodo se define como el número de nodos vecinos que se encuentran conectados al nodo (Barabasi and Oltvai, 2004; Albert, 2005). Mientras que el coeficiente de *betweenness* de un nodo se define como la proporción de caminos cortos que pasan a través del nodo respecto al total de caminos cortos que conectan todos los nodos de la red, donde un camino corto corresponde al camino más corto que permite conectar a un par de nodos (Barabasi and Oltvai, 2004; Albert, 2005). En nuestra Red Regulatoria del Tráfico los nodos que presentan un mayor grado de conectividad entre los genes de tráfico son: AT5G55080 el cual tiene un grado de conectividad igual a 19, AT5G63640 con un grado de conectividad igual a 16 y AT1G26690 con un grado de conectividad igual a 9. Estos genes codifican a la GTPasa monomérica RAN4 (RAS-RELATED NUCLEAR PROTEIN 4), a una proteína de la familia ENTH/VHS/GAT y un miembro de emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein, respectivamente (Figura 3B). El análisis de la centralidad en base al coeficiente de *betweenness* de los nodos nos muestra que los genes de tráfico que presentan mayor coeficiente de *betweenness*, esto es igual a 1, son los siguientes: AT1G09180 el cual codifica a la GTPasa monomérica SARA1A, AT1G32880 que codifica a una proteína de la superfamilia ARM repeat, AT4G03330 que codifica para SYP123, AT4G34450 el cual codifica a una proteína homóloga a la subunidad gamma-2 de COPI y AT5G08080 que codifica a SYP132 (Figura 3C). El gen AT1G09180 tiene un grado de conectividad 7, mientras que los genes AT1G32880, AT4G03330, AT4G34450 y AT5G08080 presentan un grado de conectividad de 2 (Figura 3C).

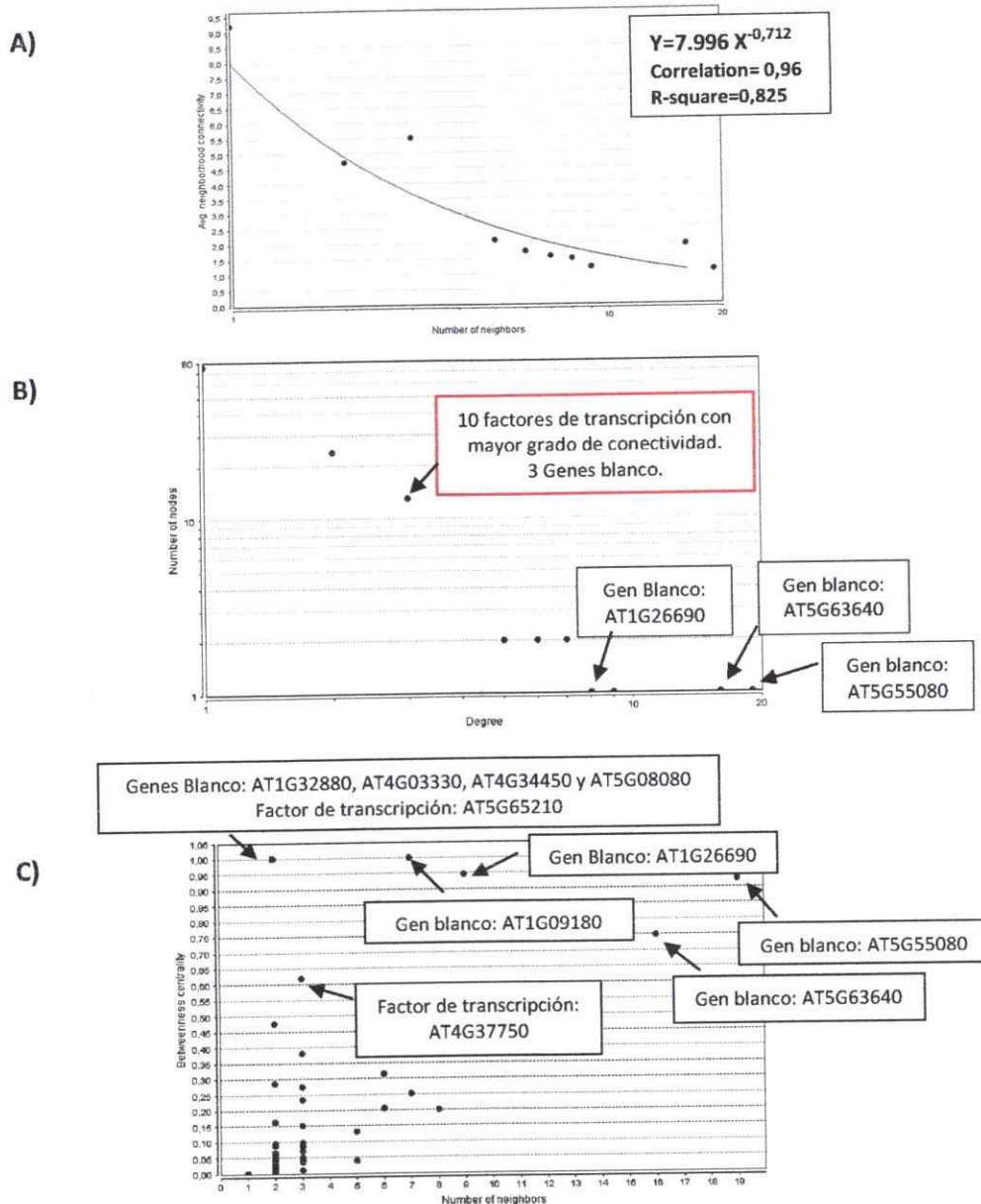


Figura 3: Análisis topológico de la Red Regulatoria del Tráfico.

La topología de la Red Regulatoria del Tráfico fue analizada utilizando el programa Cytoscape. **A)** Distribución de grado en función del grado de conectividad. Se muestra la función de la Ley de Poder de esta red. **B)** Frecuencia de grado de conectividad de la red, graficado como número de nodos en función del grado de conectividad. **C)** Coeficiente de *betweenness* en función del grado de conectividad. En los recuadros de los gráficos B y C se muestra información de los nodos más relevantes.

Este análisis nos sugiere que el gen AT1G09180 sería un gen importante en la regulación del tráfico, lo cual tiene relación con la función descrita para su producto génico, SARA1A. Esta proteína es una GTPasa monomérica involucrada en la formación de vesículas con cubierta COPII en el retículo endoplasmático con destino al aparato de Golgi, siendo importante para iniciar el tráfico de las proteínas sintetizadas *de novo* por la vía secretoria (Hanton et al., 2008; Cevher-Keskin, 2013). De manera similar los genes de tráfico AT1G32880, AT4G03330, AT4G34450 y AT5G08080 también podrían tener un papel importante en el tráfico de proteínas. Esto es particularmente interesante para el caso de los genes AT4G34450 y AT5G08080 sobre los que existe evidencia experimental acerca de su función como proteína de cubierta y sintaxina, respectivamente (base de datos TAIR, www.arabidopsis.org). Adicionalmente, con valores de *betweenness* entre 0,95 y 0,70 y con altos grados de conectividad encontramos a los genes tráfico AT1G26690, AT5G55080 y AT5G63640, los cuales presentan los más altos grados de conectividad de 9, 19 y 16, respectivamente (Figura 3B y C). Considerando, que estos tres genes de tráfico tienen altos grados de conectividad y de coeficiente de *betweenness* en la Red Regulatoria del Tráfico se convierten en posibles puntos regulatorios claves del tráfico de proteínas. Sin embargo, la función de estos genes aún no ha sido descrita a través de ensayos directos, por lo que estudios más profundos son requeridos para determinar la función e importancia de estas proteínas en el tráfico de proteínas (base de datos TAIR, www.arabidopsis.org).

Considerando que el objetivo de esta tesis es seleccionar aquellos factores de transcripción candidatos a regular el tráfico de proteínas a través del sistema de endomembrana es importante saber cuáles son los factores de transcripción con mayor

grado de conectividad en la Red Regulatoria del Tráfico. En este contexto el mayor grado de conectividad de los factores de transcripción es equivalente a 3, valor que es compartido por los siguientes factores de transcripción: AT4G37750 que codifica a AINTEGUMENTA un factor de transcripción del tipo AP2; 4 factores de transcripción de la familia MYB: AT5G04760, AT5G13820, AT1G72650 y AT2G16720 correspondientes a un factor de transcripción MYB, TBP1, TRFL6 y MYB7 un factor MYB del tipo R2R3, respectivamente; y los factores de transcripción del tipo bZIP: AT3G54620, AT1G42990, AT5G06950, AT3G10800 y AT5G44080, los cuales codifican a bZIP25, bZIP60, TGA2, bZIP28 y un parólogo de GBF4, respectivamente (Figura 3B). Entonces, de acuerdo al criterio de conectividad en la Red Regulatoria de Tráfico estos factores de transcripción son considerados como buenos candidatos a regular el sistema de endomembrana ya que poseen el mayor grado de conectividad.

En análisis de centralidad realizado en base al coeficiente de *betweenness* considerando solo a los factores de transcripción nos muestra que AT5G65210 un factor de transcripción TGA1 de la familia bZIP es el que tiene el mayor *betweenness*, igual a 1, y un grado de conectividad de 2 (Figura 3B y C). El siguiente factor de transcripción con el mayor valor de *betweenness* igual a 0,619 y que además posee un grado de conectividad 3, el más alto encontrado en la red, como fue mencionado anteriormente, es AT4G37750. Este factor de transcripción codifica a AINTEGUMENTA un factor de transcripción del tipo AP2 (Figura 3B y C). De acuerdo a este análisis topológico de la Red Regulatoria del Tráfico y utilizando los criterios basado en el coeficiente de *betweenness* y en el grado de conectividad los factores de transcripción codificados en los loci AT5G65210 y AT4G37750 son presentados como importantes candidatos a regular el tráfico de proteínas. Ambos factores de transcripción han sido

descritos como reguladores del mantenimiento del meristema apical, AT4G37750 también participa en la regulación del desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana* (Krizek, 2011; Mudunkothge & Krizek, 2012) y AT5G65210 en la respuesta a patógenos (Kesarwani et al., 2007; Shearer et al., 2012). Sin embargo, la posible regulación ejercida por estos factores de transcripción sobre el sistema de endomembranas y el tráfico de proteínas no ha sido determinada.

Adicionalmente, analizamos el grado de conectividad de cada uno de los 91 factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico en las sub-redes transcripcional y de Co-expresión. Este análisis nos permite determinar las conexiones de estos 91 factores de transcripción con los 133 genes de tráfico considerando el criterio de co-expresión y el de sobre-representación del sitio de unión de los factores de transcripción por separado y de esta forma analizar de manera independiente ambos criterios. En este análisis observamos que existen 65 factores de transcripción que presentan los más alto grados de conectividad en la Red Transcripcional correspondiente a valores de 54, 39 y 31 (Figura 4A). Interesantemente, los factores de transcripción mencionados anteriormente que presentan los más altos grados de conectividad y altos coeficientes de *betweenness* en la Red Regulatoria del Tráfico están entre estos 65 factores de transcripción con alto grado de conectividad en la Red Transcripcional.

Considerando que nuestro objetivo es seleccionar a los mejores candidatos a regular el sistema de endomembrana, y que 65 factores de transcripción poseen altos grados de conectividad, igual o superior a 20, en la Red Transcripcional, realizamos una normalización del grado de conectividad que nos permite discriminar entre los factores de transcripción que presentan una interacción preferencial con los genes de



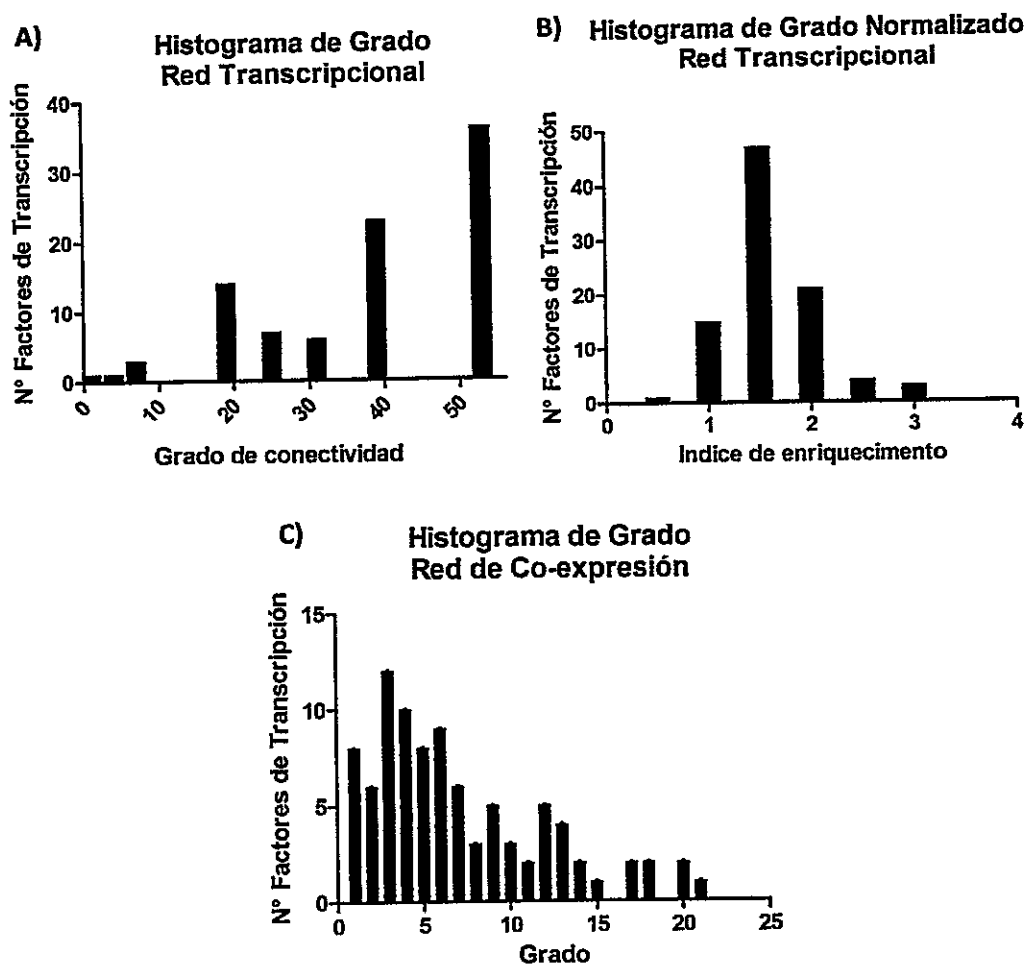


Figura 4: Análisis de la conectividad de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico en la red transcripcional y la red de co-expresión.

Se analizó la conectividad de los 91 factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico con los genes de tráfico en las sub-redes transcripcional y de co-expresión. A) Histograma de frecuencia del grado de conectividad de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico con los genes de tráfico en la red transcripcional. B) Histograma de frecuencia del Índice de Enriquecimiento de los 91 factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico GO0006886. C) Histograma de frecuencia del grado de conectividad de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico con los genes de tráfico en la Red de Co-expresión.

tráfico. Para esto definimos como Índice de Enriquecimiento a la razón entre las interacciones que establece un factor de transcripción con los genes de tráfico, expresada como un porcentaje respecto al total de los genes de tráfico, y las interacciones que establece el factor de transcripción con el total de genes del genoma de *Arabidopsis thaliana*, expresado como porcentaje de genes conectado respecto al total del genoma. De tal forma que este índice nos permite determinar cuando el factor de transcripción conecta preferentemente a genes de tráfico en comparación con el resto del genoma. Por lo tanto, cuando el índice de enriquecimiento es igual a 1, indica que el factor de transcripción conecta en la misma proporción de genes de tráfico que genes del genoma completo, mientras que índices superiores a 1 indica una conexión preferencial a los genes de tráfico. Luego, calculamos el índice de enriquecimiento para cada uno de los 91 factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico y seleccionamos a aquellos factores de transcripción que presentan un índice de enriquecimiento igual o superior a 1,5, correspondiente al 33% de los factores de transcripción de la red (Figura 4B).

De acuerdo a este criterio, 6 de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico se perfilan como buenos candidatos dado su alto grado de conectividad y coeficiente de *betweenness*, mencionados anteriormente. Estos corresponden a los siguientes factores de transcripción de tipo bZIP: AT3G10800, AT3G54620, AT1G42990, AT5G06950, AT5G44080 y AT5G65210. Los factores de transcripción previamente mencionados por su alto grado de conectividad y coeficiente de *betweenness* en la Red Regulatoria del Tráfico, MYB y AP-2, presentan un índice de interacción cercano a 1 por lo que quedan fuera de la selección realizada a través

de este criterio. Es importante destacar que utilizando el índice de enriquecimiento factores de transcripción del tipo NAC y bHLH quedan dentro de este grupo de 65 factores de transcripción por sobre los factores de transcripción de tipo bZIP con valores de 2.5 y 2.0, respectivamente, convirtiéndolos en buenos candidatos para la regulación del tráfico a través del sistema de endomembranas.

Al analizar el grado de conectividad que presentan los 91 factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico en la Red de Co-expresión observamos que 72 de ellos tiene un grado inferior 9, equivalente al 66% de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico, mientras que 19 factores de transcripción tiene un grado de conectividad igual o mayor a 9, correspondiente al 33% restante (Figura 4C). Entre los factores de transcripción con mayor grado de conectividad encontramos a los factores de transcripción de tipo bZIP, AT3G10800 y AT3G54620 los que codifican para bZIP28 y bZIP25 tal como fue mencionado anteriormente. Estos factores de transcripción presentan un grado de conectividad en la Red de Co-expresión de 18 y 20, respectivamente, y ambos comparten un índice de enriquecimiento de 1,6 en la Red Transcripcional.

Los factores de transcripción bZIP25 y bZIP28 son seleccionados como fuertes candidatos a regular el tráfico de proteínas en *Arabidopsis thaliana*, puesto que estos dos factores de transcripción han sido seleccionados a través de 3 de los 4 criterios analizados. De manera similar AT5G65210 que codifica a TGA1 otro factor de transcripción de la familia bZIP también es considerado como un buen candidato a regular el sistema de endomembrana al ser seleccionado en 3 de los criterios utilizados para la jerarquización. Sin embargo, puesto a su relación con procesos particulares

como el desarrollo floral y a la estrategia experimental necesaria para su estudio alejado de la experiencia de nuestro laboratorio no será abordado en esta tesis.

Adicionalmente, seleccionamos como potenciales candidatos a regular el sistema de endomembrana a los factores de transcripción que presentan un alto grado de conectividad a genes de tráfico en la Red de Co-expresión (33% más alto) y un alto índice de enriquecimiento (33% más alto). Estos corresponden a los siguientes factores de transcripción del tipo NAC: AT1G34190 y AT4G35580. AT1G34190 codifica a NAC017, presenta un grado de conectividad de 21 y un índice de enriquecimiento de 2.9, mientras que AT4G35580 codifica a NTL9, tiene un grado de conectividad de 15 y un índice de enriquecimiento de 2.7. Por otra parte también fueron seleccionados 3 factores de transcripción del tipo bHLH, AT4G02590, AT5G46760 y AT1G03040, los que codifican a UNE12, MYC3 y a un paralogo de UNE12 (UNE12-like). Estos factores de transcripción presentan los siguientes valores de grado de conectividad 18, 9 y 13, e índice de enriquecimiento 2,1; 2,1 y 1,6, respectivamente.

Por lo tanto, en base al análisis expuesto hemos seleccionado como los mejores candidatos a regular el tráfico de proteínas a través del sistema de endomembranas a los siguientes factores de transcripción: a los factores de transcripción del tipo bZIP, bZIP25 y bZIP28; a los factores de transcripción del tipo NAC, ANAC017 y NTL-9; y a los factores de transcripción del tipo bHLH, UNE12, MYC3 y AT1G03040. Es importante destacar que uno de los factores de transcripción seleccionados, el factor de transcripción bZIP28, corresponde a un regulador de la respuesta a proteínas mal plegadas y al estrés de retículo endoplasmático, siendo un homólogo funcional del factor de transcripción ATF6 descrito en animales (Liu et al, 2007; Tajima et al, 2008; Ron and Walter, 2007). El hecho que bZIP25 está relacionado

con la regulación de un proceso en un compartimento del sistema de endomembrana como es el retículo endoplasmático refuerza que tanto la Red Regulatoria del Tráfico, así como los criterios utilizados para la jerarquización y selección de los factores de transcripción candidatos, son efectivos para encontrar reguladores del sistema de endomembranas.

Adicionalmente, generamos una segunda versión de la Red Regulatoria del Tráfico, la que utilizó una lista curada de 486 genes de tráfico y que fue construida de igual forma de la descrita anteriormente (Anexo 5). En esta red los factores de transcripción bZIP28 y bZIP25 tienen los dos más altos valores de grado de conectividad, 16 y 14 respectivamente. Esto nos permite validar los criterios de selección utilizados para la selección de los factores de transcripción y obtener mayor información de los posibles blancos regulatorios de los factores de transcripción.

3.2 Objetivo específico 2.

Selección de posibles blancos regulatorios de los factores de transcripción de interés entre los genes de tráfico y estudio de su respuesta frente a compuestos que alteran el sistema de endomembrana.

3.2.1 Selección de posibles blancos regulatorios de los factores de transcripción entre los genes de tráfico en base a su conectividad a los factores de transcripción de interés y su respuesta a compuestos que alteran el sistema de endomembrana.

Para el estudio de la regulación transcripcional que ejercerían los factores de transcripción seleccionados sobre el tráfico de proteínas, es necesario elegir un conjunto de genes de tráfico que sean blancos de regulación de estos factores de transcripción. En la Red Regulatoria del Tráfico los factores de transcripción seleccionados conectan a un máximo de tres genes de tráfico por lo que se decidió usar un criterio menos restrictivo para determinar los genes de tráfico que podrían ser regulados a nivel transcripcional por los factores de transcripción seleccionados. Este criterio considera la sobre-representación del sitio de unión de los factores de transcripción en el promotor de los genes de tráfico, que como fue definido anteriormente corresponde a la Red Transcripcional. Bajo este criterio el conjunto de factores de transcripción seleccionados conectan a un total de 52 genes de tráfico. Para analizar el papel que cumplen los factores de transcripción en la regulación transcripcional de los genes de tráfico se seleccionaron un subconjunto 16 de genes de tráfico dentro del grupo de 52 genes de acuerdo a los criterios que se describen a continuación. La elección de este subconjunto de genes de tráfico se realizó en base a

dos criterios: 1) La conectividad de los genes de tráfico a los factores de transcripción seleccionados. Se eligió una variedad de genes de tráfico que estén conectados a cada uno de los factores de transcripción seleccionados y a la combinatoria de estos en la Red Transcripcional (Tabla 2). Esto nos permitirá contar con posibles blancos regulatorios para cada uno de los factores de transcripción y evaluar alguna posible regulación combinada entre los factores de transcripción. 2) La capacidad de los genes de tráfico a responder a tratamientos que alteran el sistema de endomembrana a través de cambio en sus niveles de transcrito. Esto nos permitirá identificar cuales genes cambian sus niveles de transcrito en respuesta a la alteración del sistema de endomembrana y por lo que podrían estar implicados en la regulación del tráfico, convirtiéndolos en interesantes candidatos para ser blancos regulatorios de los factores de transcripción seleccionados. Para determinar la respuesta a la alteración del sistema de endomembrana, se realizó un análisis de experimentos de microarreglos proveniente de la base de datos NASC (<http://affymetrix.arabidopsis.info/>) y de experimentos de microarreglos no publicados de la Dra. Norambuena realizados utilizando una droga que altera una vía de tráfico.

El análisis de las conexiones de los genes de tráfico a los factores de transcripción seleccionados en la Red Transcripcional nos muestra que los factores de transcripción seleccionados bZIP28 y bZIP25 conectan 39 genes de tráfico en la Red Transcripcional (Tabla 2). Por otra parte, los factores de transcripción bHLH seleccionados a partir de la Red Regulatoria del Tráfico conectan a 19 genes de tráfico en la Red Transcripcional, y 8 genes de tráfico están conectados en la Red Transcripcional a los factores de transcripción del tipo NAC seleccionados (Tabla 2). Interesantemente, todos los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción

Tabla 2: Lista de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados en la Red Transcripcional.

Se detalla información asociada los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados en la Red Transcripcional. Se incluye el locus del gen, el nombre asociado, a que factores de transcripción seleccionados está conectado en la Red Transcripcional, la Red Co-expresión y la Red Regulatoria del tráfico, una breve descripción de su anotación en la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org) y se le asigna la ruta de tráfico en la que participa en términos de ruta secretoria, endocítica o no descrita (N/D) en base a la información de la base de datos TAIR y NCBI. Se indica con un signo (+) cuando el gen de tráfico está conectado al factor de transcripción seleccionado del tipo bZIP, bHLH o NAC en la Red Transcripcional. Se indica a que factor de transcripción seleccionado está conectado del gen de tráfico en la Red de Co-expresión y en la Red de Tráfico. En rojo se destacan los genes de tráfico que fueron seleccionados para ser analizados en esta tesis. Adicionalmente, se incluye la información de dos genes de tráfico que no están conectados a los factores de transcripción seleccionados en la Red Transcripcional, la Red de Co-expresión y la Red Regulatoria del Tráfico, estos genes también serán analizados en esta tesis.

Gen de tráfico	Nombre	Conectado en la Red Transcripcional con			Conectado en la Red de Co-expresión con	Conectado en la Red Regulatoria del Tráfico con	Descripción	Ruta de Tráfico
		bZIP	bHLH	NAC				
AT1G09180	SARA1A	+					secretion-associated RAS super family 1	Secretoria
AT1G26690	EMP24-L1		+			NAC, UNE12, UNE12-LIKE, MYC3	emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein	Secretoria
AT1G32880	ARM-L1	+					ARM repeat superfamily protein	Endocítica
AT1G48240	NPSN12	+					novel plant snare 12	Endocítica
AT1G48550	VPS26-L1	+					Vacuolar protein sorting-associated protein 26	Endocítica
AT1G54030	MVP1	+					MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE 1	Endocítica
AT1G57620	EMP24-L2		+		+		emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein	Secretoria

AT1G60070	AP1 γ	+		Adaptor protein complex AP-1, gamma subunit	Endocítica
AT1G60780	HAP13	+		HAPLESS 13	Endocítica
AT1G60970	SNARE-L1	+		SNARE-like superfamily protein	Endocítica
AT1G73430	SEC34-L1	+		sec34-like family protein	Secretoria
AT1G76970	TMYB1	+		Target of Myb protein 1	Secretoria
AT1G77140	VPS45	+	+	vacuolar protein sorting 45	Endocítica
AT2G17380	AP19	+	+	Encodes clathrin assembly protein AP19	Endocítica
AT2G21630	SEC23/SEC24-L5	+	+	Sec23/Sec24 protein transport family protein	Secretoria
AT2G36900	MEMB11	+	+	membrin 11	Secretoria
AT2G40060	CLC2	+	+	Clathrin light chain protein 2	Endocítica
AT2G46520	IMPA-L	+	+	cellular apoptosis susceptibility protein, putative / importin-alpha re-exporter, putative	Transporte a Núcleo
AT3G01340	WD40-L1	+		Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	N/D
AT3G03800	SYP131	+		syntaxin of plants 131	Endocítica
AT3G05710	SYP43	+		syntaxin of plants 43	Secretoria
AT3G06720	IMPA-1	+		importin alpha isoform 1	Transporte a Núcleo
AT3G07680	EMP24-L3	+		emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein	Secretoria
AT3G08960	ARM-L2	+		ARM repeat superfamily protein	Transporte a Núcleo
AT3G09740	SYP71	+		syntaxin of plants 71	Endocítica
AT3G17340	ARM-L3	+		ARM repeat superfamily protein	Transporte a Núcleo
AT3G23660	SEC23/SEC24-L2	+	+	Sec23/Sec24 protein transport family protein	Secretoria
AT3G27325	HYDROLASE-1	+		hydrolases, acting on ester bonds. GPI anchor metabolic process	Endocítica
AT3G27530	GOLGIN6	+		golgin candidate 6	Secretoria
AT3G45280	SYP72	+	+	syntaxin of plants 72	Endocítica
AT3G50860	CLAT-ADAP2	+		Clathrin adaptor complex small chain family protein	Endocítica
AT3G51890	CLC3	+		Clathrin light chain protein 3	Endocítica
AT3G52400	SYP122	+		syntaxin of plants 122	Endocítica
AT3G59020	ARM-4	+	+	ARM repeat superfamily protein	Transporte a nucleo

AT3G61450	SYP73	+		+	syntaxin of plants 73	Endocítica
AT4G01800	AGY1	+			Albino or Glassy Yellow 1. ATPase subunit of the chloroplast Sec translocation machinery	N/D
AT4G01810	SEC23/SEC24-L3	+			Sec23/Sec24 protein transport family protein	Secretoria
AT4G02150	ARM-5	+			ARM repeat superfamily protein	Transporte a núcleo
AT4G03330	SYP123	+			syntaxin of plants 123	Endocítica
AT4G14160	SEC23/SEC24-L4	+			Sec23/Sec24 protein transport family protein	Secretoria
AT4G17730	SYP23	+		+	syntaxin of plants 23	Endocítica
AT4G32640	SEC23/SEC24-L1	+		+	Sec23/Sec24 protein transport family protein	Secretoria
AT4G34450	COATOMER $\gamma 2$	+			coatamer gamma-2 subunit, putative / gamma-2 coat	Secretoria
AT5G05010	CLAT-ADAP-L	+			clathrin adaptor complexes medium subunit family protein	Endocítica
AT5G05760	SYP31	+			syntaxin of plants 31	Endocítica
AT5G08080	SYP132	+		+	syntaxin of plants 132	Endocítica
AT5G42570	B CELL RECEPTOR 31	+			B-cell receptor-associated 31-like	Endocítica
AT5G63640	ENTH-L1	+			ENTH/VHS/GAT family protein	Endocítica
AT1G09080	BIP3	+			BIP3, heat shock protein	Secretoria
AT5G61790	CNX	+			CNX1, unfolded protein binding, calcium ion binding	Secretoria
AT3G10780	EMP24-L4				emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein	Secretoria
AT5G52000	IMP8				IMP8, IMPORTIN ALPHA ISOFORM 8	Transporte a Núcleo

del tipo NAC también están conectados a los factores de transcripción del tipo bHLH. Para analizar la capacidad de estos 52 genes de tráfico para responder a nivel transcripcional a estímulos que alteran o modifican el sistema de endomembranas analizamos cinco experimentos de microarreglos disponibles en la base de datos de NASC (<http://affymetrix.arabidopsis.info/>) y un experimento de microarreglo no publicado de la Dra. Norambuena. Estos experimentos incluyen el análisis de tratamientos con drogas como MG132, el cual es un inhibidor del proteasoma, tunicamicina, una droga que inhibe el correcto plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático a través de la inhibición de la N-glicosilación de proteínas; AZC un inductor de proteínas mal plegadas y estrés de retículo; IAA una hormona vegetal de tipo auxina; y PNO8 un inhibidor de la fotosíntesis (Figura 5). Adicionalmente, analizamos experimentos de microarreglo de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con el compuesto químico Sortin1, el cual altera el funcionamiento de vías de tráfico a la vacuola (Zouhar et al., 2004), realizado previamente por la Dra. Norambuena. Este conjunto de experimentos se puede dividir en tres grupos: un grupo que altera directamente el funcionamiento del sistema de endomembrana como son tunicamicina y Sortin1 (Martínez & Chrispeels, 2003; Zouhar et al, 2004; Rosado et al, 2011). Un segundo grupo que altera en cierta forma el funcionamiento del sistema de endomembrana como son MG132, AZC y la hormona vegetal IAA. Tanto AZC como MG132 pueden inducir estrés de retículo por acumulación de proteínas mal plegadas (Kamauchi et al, 2005; Ding et al, 2007), mientras que auxina puede actuar como un inhibidor de la endocitosis de membrana plasmática (Paciorek et al, 2005; Robert et al, 2010). Por último, PNO8 es una droga que inhibe el fotosistema II (Nakijima et al; 1996) y que no alteraría el funcionamiento del sistema de endomembrana. El análisis de estas distintas drogas con distintos efectos sobre el sistema de endomembrana

permite determinar que genes de tráfico responden a la alteración del sistema de endomembrana y que por lo tanto serían buenos genes blanco candidatos a ser regulados por los factores de transcripción seleccionados. Además podemos descartar aquellos genes de tráfico que responden a una droga que no altera el funcionamiento del sistema de endomembrana.

En el análisis de los experimentos de microarreglos observamos que los tratamientos con MG132 y PNO8 fueron los que generaron los mayores cambios en los niveles de transcrito de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados (Figura 5). Mientras que el tratamiento con tunicamicina, AZC, auxina y Sortin1 genera cambios leves en los genes de tráfico, menores de 2 veces respecto al tratamiento control, exceptuando a *SARA1A* (AT1G09180) el cual aumenta alrededor de 4 veces sus niveles de transcrito en respuesta a tunicamicina y AZC (Figura 5). Consideramos como cambios en los niveles de transcrito provocados por la alteración del sistema de endomembrana a los cambios provocados por la respuesta a las drogas que alteran de manera directa el funcionamiento del sistema de endomembrana tales como, Tunicamicina, y Sortin1, y los cambios provocados por los tratamientos con las drogas que alteran el sistema de endomembrana de manera indirecta como AZC, MG132 y auxina. Dentro de este grupo de genes de tráfico seleccionamos a los posibles blancos regulatorios de los factores de transcripción de interés. Por otro lado los genes de tráfico que cambian sus niveles de transcrito en el tratamiento con una droga no relacionada al sistema de endomembrana como es el PNO8, fueron descartados de la selección debido a que estos genes de tráfico no presentaron especificidad en la respuesta a drogas que alteran el sistema de endomembrana.

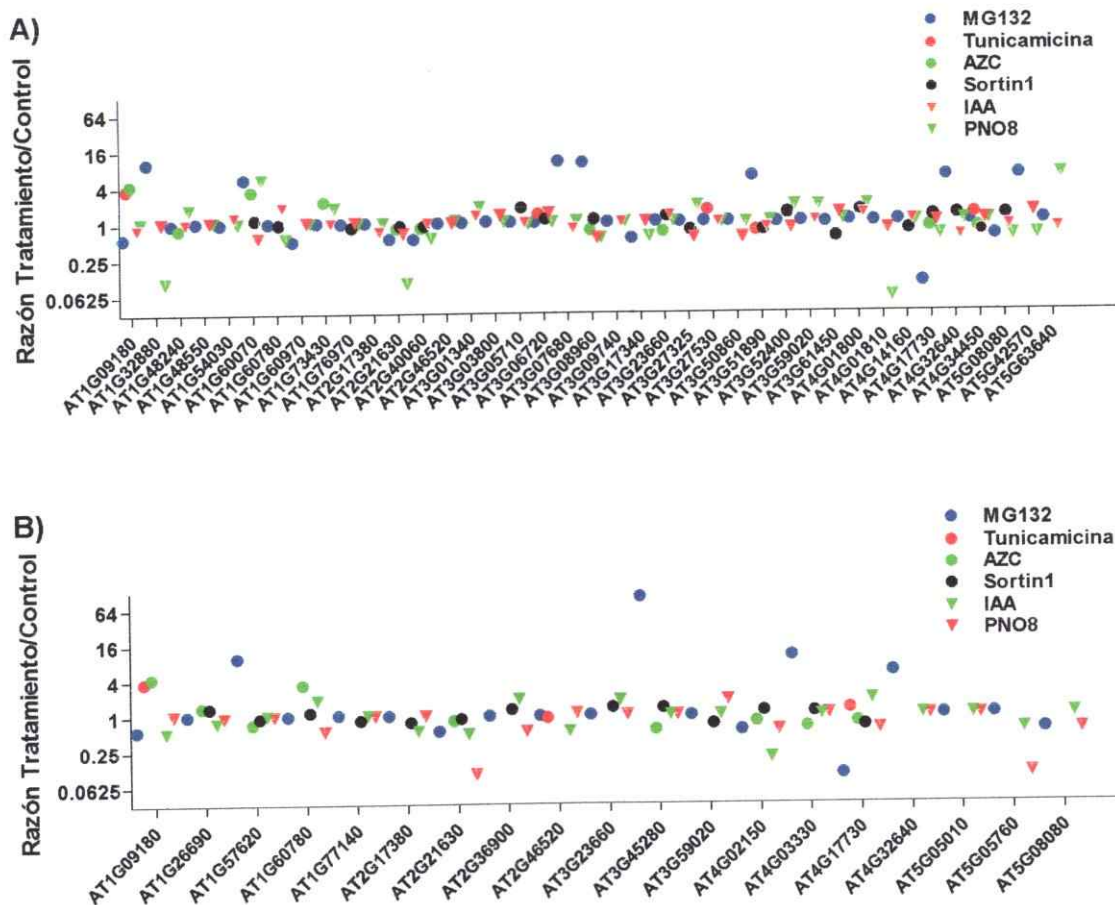


Figura 5: Respuesta transcripcional de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados a la alteración mediada por drogas que alteran el sistema de endomembrana.

Se determinó el cambio de los niveles de transcrito de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados a través de análisis de experimentos de microarreglos públicos de la base de datos NASC de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con las drogas que alteran de manera directa o indirecta el funcionamiento del sistema de endomembrana: MG132, Tunicamicina, AZC y IAA y de un experimento de microarreglo de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con la droga Sortin1 (dato no publicado, Dra Lorena Norambuena). Además se incluye el análisis del tratamiento con PNO8 una droga que altera el funcionamiento de fotosistema II (base de datos NASC), el cual sirve como control negativo de la respuesta a la alteración del sistema de

endomembrana. El nivel de transcrito es expresado como razón de transcrito en el tratamiento con la droga comparado con la condición control. **A)** Razón de cambio de los niveles de transcrito entre tratamiento y control de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados tipo bZIP en la Red Transcripcional. **B)** Razón de cambio de los niveles de transcrito entre tratamiento y control de los genes de tráfico conectados a los factores de transcripción seleccionados del tipo bHLH en la Red Transcripcional. 8 de estos genes de tráfico a su vez están conectados a los factores de transcripción seleccionados del tipo NAC en la Red Transcripcional (Tabla 2).

Para analizar un conjunto diverso de genes que responden a la alteración del sistema de endomembrana se seleccionaron genes de tráfico considerando los dos criterios previamente mencionados, esto consideran que presenten conexiones con al menos a uno de los factores de transcripción y la combinatoria de ellos y que respondan de manera preferente a las drogas que alteran el sistema de endomembrana. Usando estos criterios seleccionamos a los genes de tráfico destacados en la Tabla 2 como posibles blancos de regulación de los factores de transcripción seleccionados. Adicionalmente, utilizaremos 4 genes de tráfico que no están conectados a los factores de transcripción seleccionados tales como, AT3G10780 y AT3G5200 (Tabla 2), los cuales no deberían ser blancos de regulación de los factores de transcripción seleccionados.

3.2.2 Efecto de la inhibición de vías de tráfico mediada por BFA sobre los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados.

Para establecer un modelo experimental que nos permita estudiar la regulación de genes de tráfico analizamos el efecto de dos compuestos químicos que alteran el funcionamiento de vías de tráfico como son Brefeldina A (BFA) y Sortin2 sobre los genes de tráfico seleccionados. BFA es una droga que perturba vías secretorias y vías de reciclaje endocítico a través de la inhibición de proteínas del tipo ARF-GEF (Figura 1; Robinson et al., 2008). En plantas se ha descrito que BFA inhibe a la proteína ARF-GEF denominada GNOME, homologa a GBF1 de mamíferos y Gea1/2p de levaduras (Peyroche et al., 1999; Niu et al., 2005). GNOME participa en el reciclaje endocíticos de proteínas, mientras en sus ortólogos de mamífero y levadura participan en el tráfico

retrogrado entre Aparato de Golgi y Retículo endoplasmático (Geldner et al, 2003). Adicionalmente, se ha descrito que BFA es capaz de provocar la tubulación de las cisternas del Aparato de Golgi y su retracción al Retículo endoplasmático en determinadas condiciones en algunos tipos celulares de *Arabidopsis thaliana* (Robinson et al., 2008; Richter et al., 2007, Teh & Moore, 2007). Esto ocurriría por la inhibición de una o más de las 5 ARF-GEF de *Arabidopsis thaliana* que presentan cierta sensibilidad a BFA (Sata et al., 1999, Richter et al., 2007, Teh & Moore, 2007). Por otra parte, Sortin2 es un compuesto químico de origen sintético identificado en una búsqueda de compuestos que alteran el tráfico de la proteína vacuolar provocando su secreción en *Saccharomyces cerevisiae* (Zohuar et al., 2004). Además, se ha descrito que en plantas esta droga provoca una aceleración de la endocitosis de proteínas de membrana plasmática a la vacuola, acelerando el tráfico desde endosomas TGN/EE y MVB/PVC hacia la vacuola (Figura 1; Pérez-Henríquez et al., 2012).

A través de la perturbación de las vías de tráfico mediada por BFA y Sortin2 se estudió el efecto provocado por estas drogas sobre los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados (Tabla 2). De esta forma, se determinó qué genes de tráfico son capaces de responder a estos tratamientos, permitiéndonos tener un modelo experimental para estudiar los cambios de niveles de transcrito de estos genes en respuesta a estas drogas en las mutantes con pérdida de función de los factores de transcripción que son objeto de estudio de esta tesis.

BFA es una droga capaz de inhibir el reciclaje endocítico provocando la acumulación de membrana y proteínas en endosomas, los cuales se agregan formando el cuerpo de BFA, (Geldner et al, 2003; Kleine-Vehn et al, 2008). Proteínas intrínsecas de la membrana plasmática, como la proteína PIN2 es endocitado hacia el

TGN/EE y luego puede regresar a la membrana plasmática a través del reciclaje endocítico (Figura 1, Kleine-Vehn et al, 2008). Por lo que en el tratamiento con BFA tanto proteínas que reciclan y membrana plasmáticas son acumulados en los cuerpos de BFA. Esta propiedad fue utilizada para verificar el efecto de esta droga en los tratamientos realizados para estudiar el efecto de la inhibición mediada por BFA, en los niveles de transcrito de los genes seleccionados. Para verificar la inhibición ejercida por BFA en nuestros experimentos se utilizó la línea PIN2::PIN2-GFP, en paralelo al tratamiento de las plantas silvestres que fueron utilizadas para la determinación de los niveles de transcrito. La línea PIN2::PIN2-GFP expresa bajo el promotor PIN2 a la proteína de membrana plasmática PIN2 fusionada a GFP. Luego del tratamiento con BFA la proteína PIN2-GFP se acumula en el cuerpo de BFA permitiendo comprobar el efecto de la droga mediante la inhibición del reciclaje endocítico por microscopía confocal (Figura 6). Para analizar el efecto de la inhibición de vías de tráfico mediada por BFA se realizaron tratamientos de plantas silvestres de ecotipo Col-0 con BFA 50 μ M por 2, 5 y 10 horas. El análisis a distintos tiempos de incubación con la droga permite determinar a qué tiempo de incubación de los probados se observa la mayor respuesta transcripcional, entregando información acerca del dinamismo de la respuesta y encontrar un punto donde la respuesta transcripcional es mayor, el cual será utilizado para estudiar la función de los factores de transcripción seleccionados.

Una vez verificado el efecto de la BFA en los tratamientos de 2, 5, y 10 horas se evaluó el efecto que provoca la inhibición mediada por esta droga sobre la expresión de los genes de tráfico seleccionados, en la sección 2.2.2. Para ello se aisló el RNA de las plantas y se cuantificó el nivel de transcrito mediante RT-qPCR. Este análisis mostró que los mayores cambios en los niveles de transcrito de los genes de tráfico

seleccionados se produjeron en el tratamiento de 5 horas con BFA (Figura 7). Este resultado muestra que la respuesta a la inhibición de las vías de tráfico mediada por BFA presenta una dependencia al tiempo de exposición a la droga sugiriendo que esta respuesta transcripcional está sujeta a una regulación dinámica. En respuesta al tratamiento de 5 horas con BFA observamos que aumentan los niveles de transcrito de tres genes de tráfico que codifican para proteínas asociadas a procesos de síntesis y secreción de proteínas: *SARA1A*, *EMP24-L1* y *BIP3* (Figura 7B). Donde *SARA1A* participa en la formación de las vesículas que trafican entre retículo endoplasmático y aparato de Golgi, de manera similar, las proteínas del tipo *EMP24* están relacionadas a la selección de cargo e interacción con proteínas de cubierta de las vesículas en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Anantharaman & Aravind, 2002); y *BIP3* es una chaperona del retículo endoplasmático. Esto nos sugiere que la inhibición de las vías de tráfico mediada por BFA provoca principalmente cambios en los niveles de transcrito de genes de tráfico involucrados en vías tempranas de la ruta secretoria como son las vías participantes en el tráfico entre retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, los cuales serán denominados genes secretorios (Figura 1; Tabla 2). Este resultado concuerda con otro de los efectos descritos de la droga BFA en plantas, esto es la inhibición del tráfico desde el aparato de Golgi al retículo endoplasmático. La inhibición de esta vía provoca defecto en tráfico desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, provocando una sobrecarga de proteínas en el retículo endoplasmático lo que desencadena estrés en estrés compartimento (Takác et al, 2011). Se ha sido descrito que en respuesta a estrés de retículo endoplasmático aumenta el nivel de transcrito de *SARA1A* y *BIP3* (Martínez & Chrispeels, 2003). Estos antecedentes indican que la inhibición mediada por BFA a nivel del tráfico desde el aparato de Golgi al retículo endoplasmático provoca la inducción de *SARA1A*, *BIP3* y

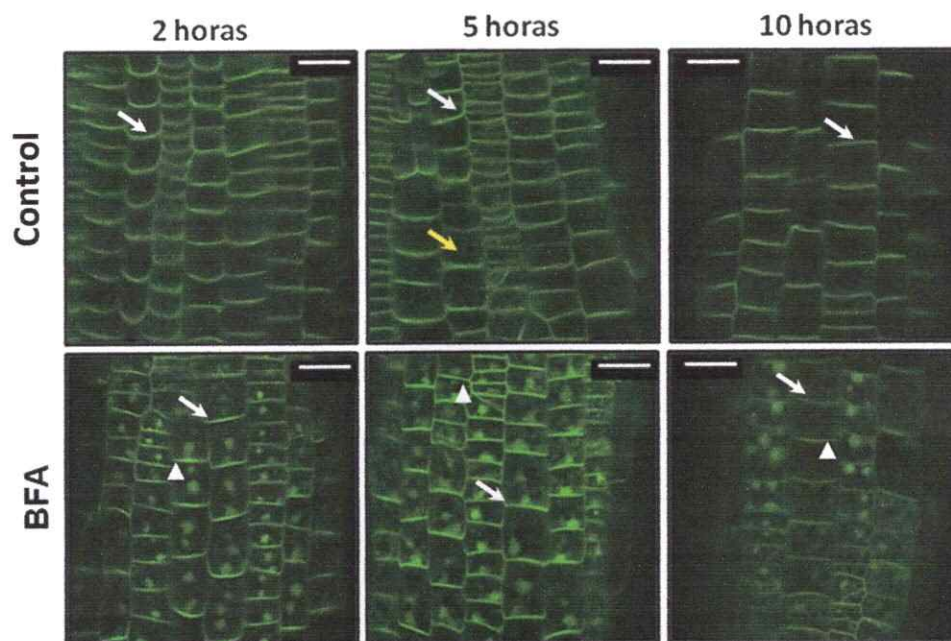


Figura 6: Verificación la inhibición del reciclaje endocítico mediado por BFA en células de la raíz de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan PIN2-GFP.

Visualización de la proteína marcadora PIN2-GFP en células de la punta de la raíz de plantas transgénicas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* PIN2::PIN2-GFP de 10 días mediante microscopía confocal. Se realizaron incubaciones con BFA 50 μM por 2, 5 y 10 horas a plantas de *Arabidopsis thaliana*. En el tratamiento control la proteína marcadora se localiza en la membrana plasmática (flechas blancas) y en endosomas (flechas amarillas), mientras que en el tratamiento con BFA se observa en la membrana plasmática y acumulada en un agregado llamado cuerpo de BFA (punta de flecha). Imágenes representativas de experimentos realizados en triplicado. Barra de tamaño = 20 μm .

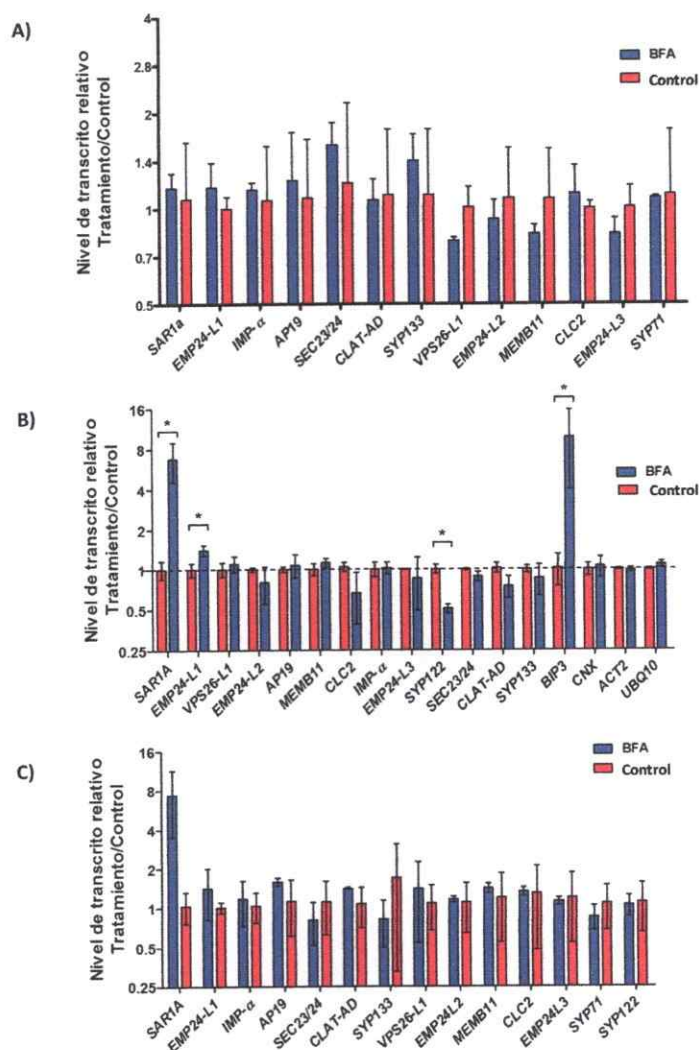


Figura 7: Efecto de la inhibición de vías de tráfico mediada por BFA en los niveles de transcritos de los genes de los tráfico seleccionados.

Los niveles de transcritos de los genes de tráfico seleccionados en esta tesis fueron cuantificados mediante RT-qPCR en plantas silvestres de 10 días incubadas con BFA 50 μ M por 2 (A), 5 (B) y 10 (C) horas. El nivel de transcritos en el tratamiento con BFA (azul) es expresado como nivel de transcritos relativo a las plantas incubadas en el tratamiento control (rojo). Los tratamientos se realizaron en triplicado utilizando 30 individuos. (*) Cambios estadísticamente significativos respecto al control y a los genes housekeeping (act2 y ubq10) analizada mediante una prueba estadística t-student, $p \leq 0,05$.

también *EMP24-L1*, lo que es concordante con una respuesta generada por el estrés de retículo endoplasmático que induciría BFA. Interesantemente, nuestro análisis muestra que en respuesta al tratamiento con BFA por 5 horas disminuyen los niveles de transcrito de *SYP122* (Figura 7B), el cual codifica para una sintaxina localizada en la membrana plasmática e involucrada en la recepción de vesículas en la membrana plasmática (Uemura et al., 2004, Tyrrell et al., 2007). Esta disminución de los niveles de transcrito de *SYP122* puede ser interpretada como un efecto compensatorio a la inhibición mediada por BFA, ya que podría aumentar los niveles de *SYP122* en la membrana plasmática favoreciendo el tráfico hacia esta membrana y de esta forma el reciclaje endocítico.

Este análisis nos indica que la alteración de vías de tráfico mediada por BFA, genera cambios en los niveles de transcritos de algunos genes de tráfico que puede ser correlacionada con el efecto de BFA sobre las dos vías inhibidas por BFA: reciclaje endocítico y el tráfico desde el aparato de Golgi a retículo endoplasmático, sugiriendo especificidad en esta respuesta. Esto nos indica que los genes de tráfico pueden ser regulados a nivel transcripcional en respuesta a la alteración del funcionamiento de las vías de tráfico inhibidas por BFA. Por otra parte, estos resultados muestran que el uso de BFA en las condiciones presentadas es una herramienta útil para estudiar la regulación transcripcional del tráfico de proteínas a través del sistema de endomembrana.

Adicionalmente, cuantificamos los niveles de transcrito de los factores de transcripción seleccionados en los tratamientos con BFA antes mencionados, determinando si alguno de los factores de transcripción seleccionados son capaces de responder a la inhibición mediada por BFA. Este análisis entrega información indirecta

acerca de una posible participación de estos factores de transcripción en la respuesta a BFA, a pesar que la falta de respuesta este tratamiento no descarta la participación de estos factores de transcripción. En este análisis transcripcional observamos que los mayores cambios de los niveles de transcrito también ocurren a las 5 horas de tratamiento con BFA, indicando que la modulación de la expresión de estos genes es dependiente del tiempo de exposición a la droga (Figura 8). Luego, de 5 horas de tratamiento con BFA se detectó un aumento de los niveles de transcrito de *bZIP28* y *MYC3* (Figura 8B). Esta respuesta transcripcional a la alteración de vías de tráfico provocada por el tratamiento con BFA sugiere que estos factores de transcripción podrían estar implicados en la regulación del funcionamiento del sistema de endomembrana. Consistentemente con esto, *SARA1A* y *BIP3* están conectados a *bZIP28* en nuestra Red Transcripcional (Tabla 2) y evidencia experimental ha demostrado que *bZIP28* participa en la regulación de estos dos genes en respuesta a *EMP24-L1* está conectado a *MYC3* en la Red Transcripcional, sugiriendo que la expresión de *EMP24-L1* podría estar siendo regulada por este factor de transcripción (Tabla 1). *bZIP28* y *MYC3* aumentan sus niveles de transcrito en respuesta a la inhibición mediada por BFA, lo que nos sugiere que estos factores de transcripción participan regulando de manera positiva la expresión de los genes de tráfico *SARA1A*, *BIP3* y *EMP24-L1*, los cuales que aumentan los niveles de transcrito en respuesta a BFA. Sin embargo, estudios posteriores son necesarios para establecer la interacción regulatoria entre estos factores de transcripción y estos genes de tráfico.

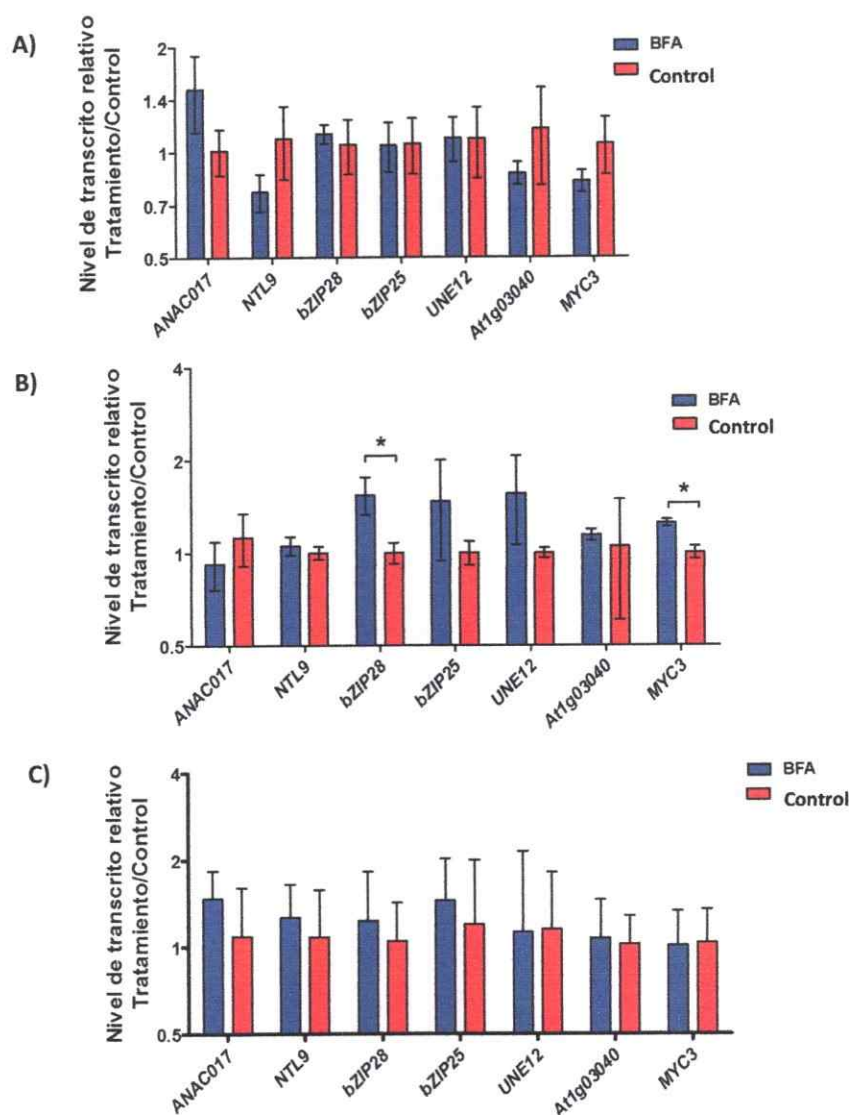


Figura 8: Efecto de la inhibición de vías de tráfico mediada por BFA en los niveles de transcritos de los factores de transcripción seleccionados.

Los niveles de transcritos de los factores de transcripción seleccionados en esta tesis fueron cuantificados mediante RT-qPCR en plantas silvestres de 10 días incubadas con BFA 50 μ M por 2 (A), 5 (B) y 10 (C) horas. El nivel de transcritos en el tratamiento con BFA (rojo) es expresado como nivel de transcritos relativo a las plantas incubadas en el tratamiento control (azul). Los tratamientos se realizaron en triplicado utilizando 30 individuos. (*) Cambios estadísticamente significativos respecto al control y a los genes housekeeping (*act2* y *ubq10*) analizada mediante una prueba estadística t-student, $p \leq 0,05$.

2.2.3 Efecto de la inhibición de vías de tráfico mediada por Sortin2 sobre los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados.

Para determinar si los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados conectados a los factores de transcripción de interés son capaces de responder a otras alteraciones de las vías de tráfico, se analizó la respuesta a Sortin2, un inductor del tráfico desde PVC/MVB a vacuola. De esta forma se analizará la capacidad que tienen estos genes de tráfico para responder a la alteración del funcionamiento del tráfico y se identificará cuál de estos genes cambia sus niveles de transcrito frente a la alteración del tráfico mediada por Sortin2. Por lo tanto, se determinará si la aceleración del tráfico a vacuola mediado por la droga Sortin2 permite inducir cambios en los niveles de transcrito de algunos de los genes de tráfico seleccionados. Para esto se trataron plantas silvestres de ecotipo Col-0 con Sortin2 50 µg/mL por 3 y 6 horas, como control del tratamiento se evaluaron plantas silvestres tratadas con el volumen de solvente equivalente al utilizado en el tratamiento con Sortin2. Se ha descrito que Sortin2 acelera el tráfico endocítico de proteínas de la membrana plasmática, como PIN2, y de membrana plasmática hacia la vacuola. Esto queda evidenciado por la presencia de un mayor número de compartimentos del tipo PVC/MVB (endosomas tardíos) luego de tres horas de incubación con la droga comparado con la condición control (Pérez-Henríquez et al, 2012). A las seis horas de incubación con la droga, la proteína PIN2 ha alcanzado la vacuola, mientras que en la condición control esta proteína no ha alcanzado la vacuola (Pérez-Henríquez et al, 2012). De manera análoga a lo realizado en el tratamiento con BFA, se realizaron los tratamientos con Sortin2 y la condición control sobre la línea PIN2::PIN2-GFP, para verificar la eficacia del tratamiento con Sortin2 a nivel celular mediante microscopía confocal (Figura 9).

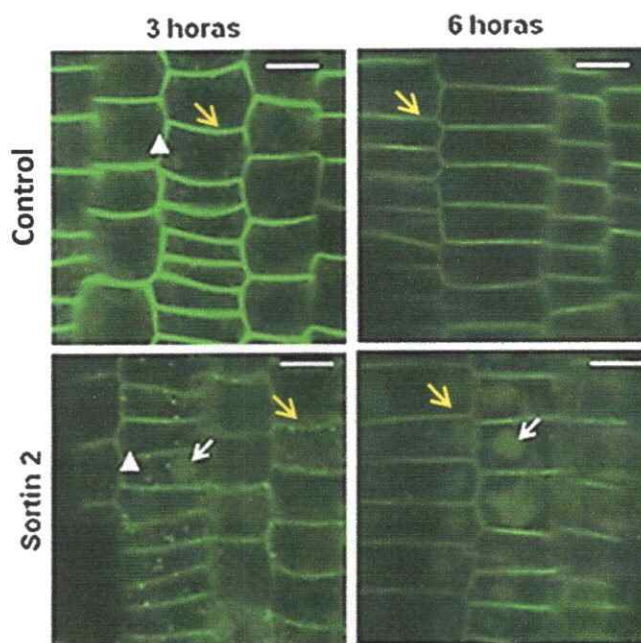


Figura 9: Verificación la inducción del tráfico desde endosomas a vacuola mediado por Sortin2 en células de la raíz de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan PIN2-GFP.

Visualización de la proteína marcadora PIN2-GFP en células de la punta de la raíz de plantas transgénicas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* PIN2::PIN2-GFP de 10 días mediante microscopía confocal. Se realizaron incubaciones con Sortin2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 3 y 6 horas a plantas de *Arabidopsis thaliana*. En el tratamiento control la proteína marcadora se localiza en la membrana plasmática (flecha amarilla) y en endosomas (puntas de flecha). En el tratamiento con Sortin2 la proteína marcadora se observa en la membrana plasmática, en endosomas y en la vacuola (flecha blanca). Imágenes representativas de experimentos realizados en triplicado. Barra de tamaño = 20 μm .

Luego de verificar el efecto de Sortin2 a nivel celular, en los tratamientos de 3 y 6 horas se extrajo el RNA de las plantas tratadas con Sortin2 y de la condición control y se determinó los niveles de transcrito de los genes de tráfico y los factores de transcripción seleccionados mediante RT-qPCR (Figura 10 y 11). En este análisis observamos que en el tratamiento de 3 horas con Sortin2 los niveles de transcrito de EMP24-L2 y IMPA-L disminuyen, mientras que en el tratamiento de 6 horas con Sortin2 no detectamos cambios significativos en los niveles de transcrito en ninguno de los genes analizados (Figura 10). Estos resultados nos muestran que la inducción de una vía de tráfico endocítica, mediada por Sortin2, disminuye la expresión de EMP24-L2 un gen de tráfico que codifica a una proteína asociada a la selección de cargo e interacción con proteínas de cubierta de las vesículas en el retículo endoplasmático y del aparato de Golgi (Anantharaman & Aravind, 2002). También disminuye la expresión de IMP- α -L, un gen que codifica a una proteína involucrada con el transporte nuclear de proteínas. La función de estas proteínas no se relaciona directamente con la alteración del tráfico provocada por Sortin2 sobre la ruta endocítica. Sin embargo, los cambios en los niveles de transcrito de estos genes de tráfico podrían tener relación con algún otro efecto de esta droga sobre las vías de tráfico secretorio. Se ha descrito que Sortin2 induce la secreción al apoplasto de la proteína vacuolar CPY (Zohuar et al., 2004). Adicionalmente, otros genes de tráfico no analizados en esta tesis, podrían estar siendo regulados en respuesta a la alteración de la ruta endocítica mediada por Sortin2. Por otra parte, el efecto del tratamiento con Sortin2 en relación al tiempo sugiere que la inducción de la vía de tráfico provocada por Sortin2 generaría cambios a nivel transcripcional de estos genes de tráfico a 3 horas o tiempos más tempranos y transitorios, ya que luego a las 6 horas de tratamiento los niveles de transcrito EMP24-L2 y IMPA-L son similares a la condición control.

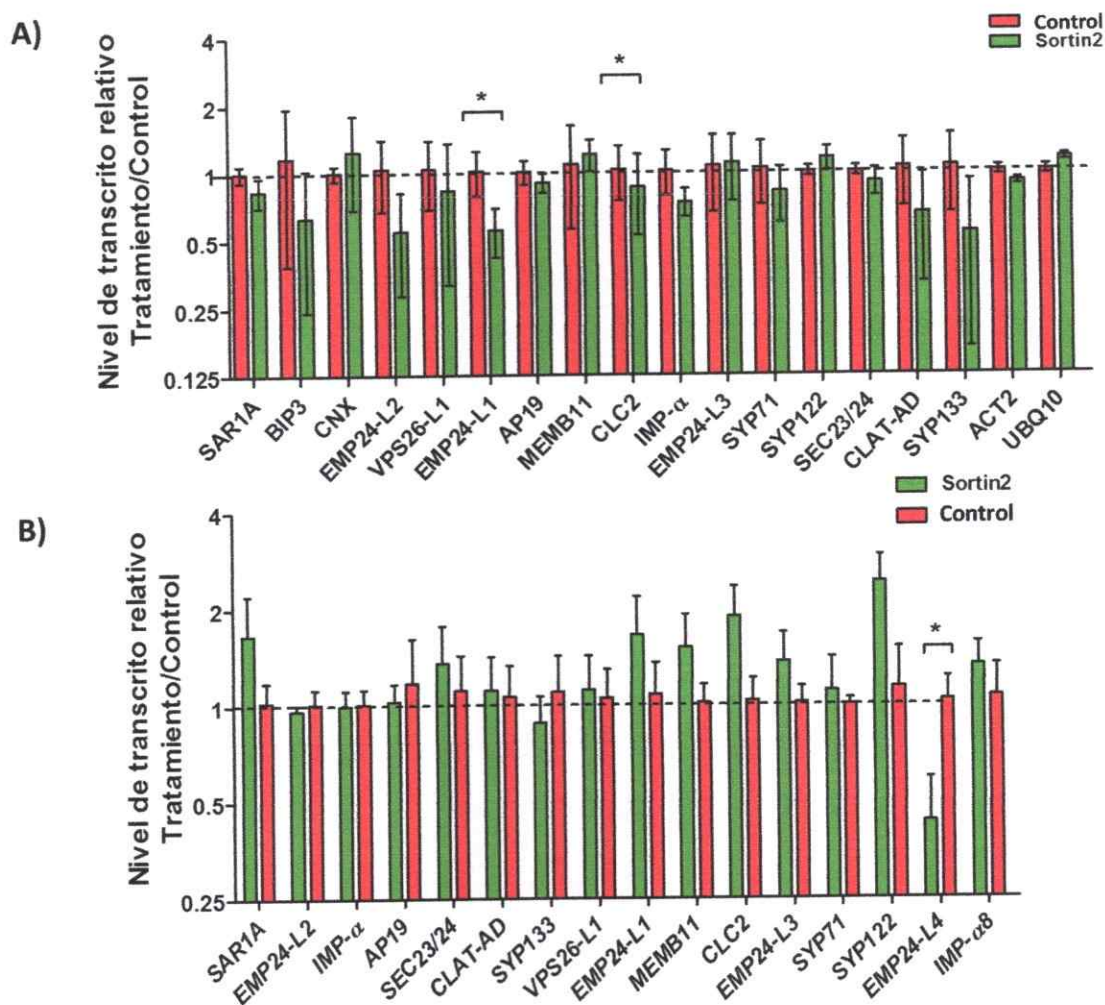


Figura 10: Efecto la inducción del tráfico desde endosomas a vacuola mediado por Sortin2 sobre los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados.

Los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados en esta tesis fueron cuantificados mediante RT-qPCR en plantas silvestres de 10 días incubadas con Sortin2 50 μ g/mL por 3 (A) y 6 (B) horas. El nivel de transcrito en el tratamiento con Sortin2 (barra verde) es expresado como nivel de transcrito relativo a las plantas incubadas en el tratamiento control (barra rojo). Los tratamientos se realizaron en triplicado utilizando 30 individuos. (*) Cambios estadísticamente significativos respecto al control y a los genes housekeeping (act2 y ubq10) analizada mediante una prueba estadística t-student, $p \leq 0,05$.

Interesantemente, los dos genes de tráfico que cambian sus niveles de transcrito en el tratamiento con Sortin2 están conectados a factores de transcripción tipo bHLH en la Red Transcripcional (Tabla 2), sugiriendo la participación de factores de transcripción de este tipo en la regulación transcripcional de estos genes. El análisis de los niveles de transcrito de los factores de transcripción seleccionados no mostró diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con Sortin2 a 3 y 6 horas (Figura 11). Por lo tanto, en base a la capacidad de responder frente al tratamiento con esta droga, no es posible relacionar a ninguno de los factores de transcripción seleccionados.

El análisis de la respuesta transcripcional a las drogas BFA y Sortin2 en las condiciones utilizadas, muestra que en los tratamientos con Sortin2 un máximo de 2 genes de tráfico responden a nivel transcripcional, mientras que en los tratamientos con BFA un máximo de 4 genes de tráfico de los analizados cambian sus niveles de transcrito. En base a esto utilizaremos como modelo de respuesta a la alteración del tráfico con tratamientos con BFA y esto será utilizado como herramienta para analizar la participación de los factores de transcripción seleccionado en la regulación del tráfico. En conjunto, el análisis de la respuesta transcripcional de los genes de tráfico seleccionados en respuesta a la alteración del tráfico mediante el uso de BFA y Sortin2, indica que la expresión de estos genes puede ser modulada en respuesta a la alteración del tráfico de proteínas. Los genes que son modulados dependerían de la vía de tráfico alterada y el tiempo en el que es sostenida esta perturbación, indicando especificidad y dinamismo en la respuesta. Por lo tanto, esto nos sugiere que existiría un sistema de regulación transcripcional de los genes de tráfico, y por lo tanto del tráfico de proteínas, complejo y dinámico.

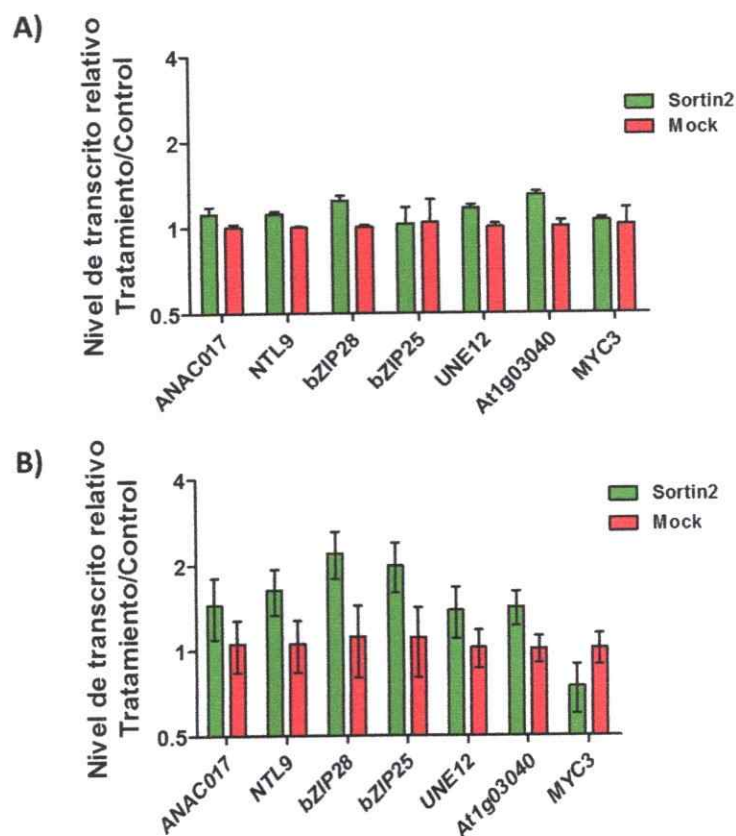


Figura 11: Efecto la inducción del tráfico desde endosomas a vacuola mediado por Sortin2 sobre los niveles de transcrito de los factores de transcripción seleccionados.

Los niveles de transcrito de los factores de transcripción seleccionados en esta tesis fueron cuantificados mediante RT-qPCR en plantas silvestres de 10 días incubadas con Sortin2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 3 (A) y 6 (B) horas. El nivel de transcrito en el tratamiento con Sortin2 (verde) es expresado como nivel de transcrito relativo a las plantas incubadas en el tratamiento control rojo). Los tratamientos se realizaron en triplicado utilizando 30 individuos. (*) Cambios estadísticamente significativos respecto al control y a los genes housekeeping (act2 y ubq10) analizada mediante una prueba estadística t-student, $p \leq 0,05$.

3.3 Objetivo específico 3.

Estudio de la función del/los factores de transcripción seleccionados en la regulación de vías de tráfico y en procesos fisiológicos dependientes de estas vías utilizando genética funcional.

Realizamos análisis genéticos funcionales para estudiar la participación de los factores de transcripción seleccionados utilizando líneas mutantes insercionales del tipo SALK provenientes del banco de semillas ABRC (Anexo 2). Iniciamos la búsqueda de factores de transcripción que participan en la regulación del tráfico de proteínas y en la respuesta a la alteración de éste en *Arabidopsis thaliana*, a través del análisis de tres de los factores de transcripción seleccionados, correspondientes a MYC3, bZIP28 y bZIP25. Identificamos líneas mutantes insercionales homocigotas de estos tres factores de transcripción las cuales fueron utilizadas en el desarrollo de esta tesis. Las mutantes insercionales de bZIP28 llamadas *bzip28-1* y *bzip28-2* han sido previamente descritas y estudiadas por Liu et al. (2007), quienes determinaron la participación de bZIP28 en la respuesta al estrés de retículo endoplasmático. Para el factor de transcripción MYC3, se ha identificado una línea mutante insercional la cual ha sido denominada *myc3-1*. Este factor de transcripción ha sido recientemente descrito como un regulador de metabolitos secundarios tóxicos para insectos (Schweizer et al., 2013). Por otra parte, hemos identificado dos mutantes insercionales homocigotas de bZIP25, las cuales han sido denominadas: *bzip25-1* y *bzip25-2*. La mutante *bzip25-1* presenta la inserción de T-DNA la región 5' no traducible del gen y no muestra diferencias en los niveles de transcrito de bZIP25, mientras que en la mutante *bzip25-2* la inserción de T-DNA está interrumpiendo una porción codificante del primer exón del gen y además presenta una

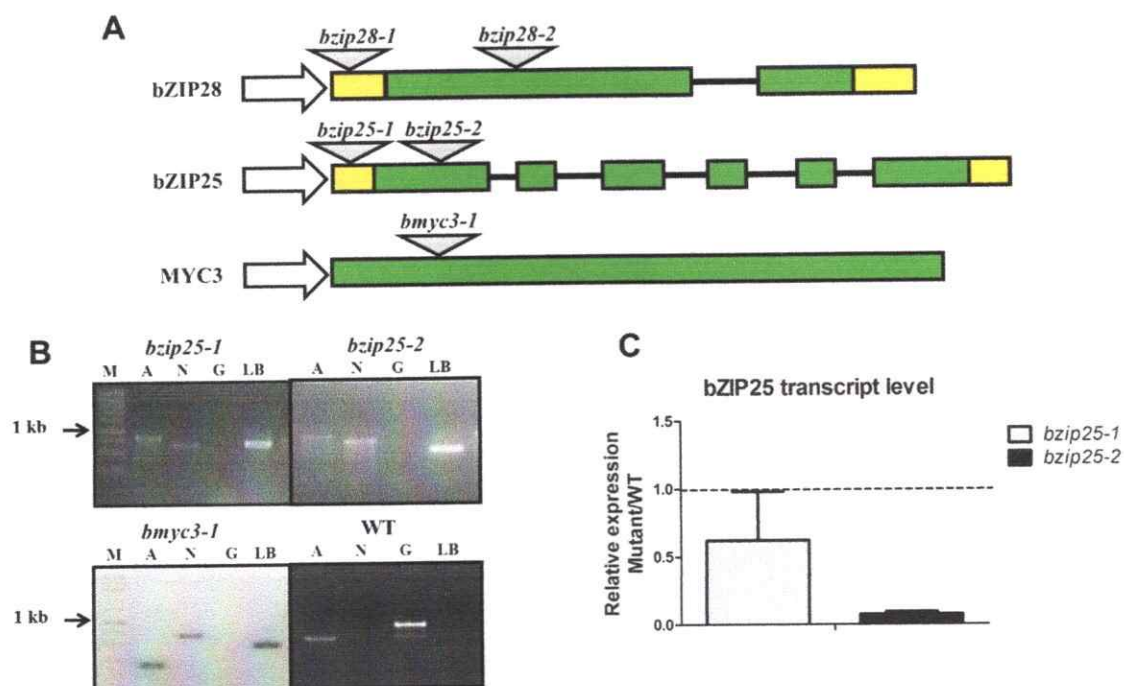


Figura 12: Mutantes insercionales de los factores de transcripción seleccionados utilizados en esta tesis.

A) Esquema de la posición de la inserción de T-DNA en las mutantes de los factores de transcripción bZIP25, bZIP28 y MYC3. Se indica con bloques amarillos la región 5' y 3' no traducible y en verde la región codificante, los intrones son representados por líneas negras y las inserciones por triángulos grises. B) Genotipificación realizada mediante PCR de las líneas homocigotas *bzip25-1*, *bzip25-2* y *myc3-1*. Se amplificó por PCR una región del alelo silvestre de bZIP25 (G) y de una región del alelo mutado por la inserción de T-DNA (LB); y como control de la presencia de la inserción y de la calidad del DNA, un fragmento del gen que confiere resistencia a kanamicina, nptII (N) y del gen de actina (A), respectivamente. Este análisis fue realizado por Arantzasú Bidegain, estudiante de Ing. en Biotecnología Molecular (Universidad de Chile). C) Cuantificación del nivel de transcritos de bZIP25 en las plantas mutantes el cual es presentado como transcritos relativos de la línea mutante respecto a la línea silvestre. (*) Cambios estadísticamente significativos respecto al control y los genes housekeeping (*act2*, *ubq10*, t-student $p=0,05$).

disminución de los niveles de transcrito de *bZIP25* superior al 90%, por lo que es considerada una mutante deficiente de *bZIP25* (Figura 12). *bZIP25* es un factor de transcripción que se expresa en diversos órganos de la planta, principalmente en tallo, raíz, botones florales, carpelo y polen (Weltmeier et al, 2009).

Para estudiar el posible papel de estos factores de transcripción en la regulación del tráfico de proteínas se analizó la estructura de compartimentos del sistema de endomembrana como la vacuola y el retículo endoplasmático. Este análisis fue realizado a través del uso de proteínas marcadoras de estos compartimentos y el tráfico de un trazador de membrana plasmática a vacuola en condición control y en respuesta a drogas que inhiben ciertas vías de tráfico por la que el trazador unido a la membrana es conducido en líneas mutantes de algunos de los factores de transcripción seleccionados y en plantas silvestre.

2.3.1 Análisis de la estructura de compartimento del sistema de endomembrana mediante el uso de proteínas marcadoras.

Como primera aproximación estudiamos localización de algunos marcadores proteicos de compartimentos del sistema de endomembrana para analizar la morfología de estos compartimentos y localización de estos marcadores en el compartimento de destino en líneas mutantes de los factores de transcripción seleccionados. Este tipo de aproximación nos entrega información acerca de la existencia de algún defecto general en el sistema de endomembrana al analizar la estructura de los compartimentos o un defecto particular del tráfico si observamos la localización errada de los marcadores. Para realizar esta análisis utilizamos marcadores proteicos de retículo endoplásmico (mCherry-HDEL; Rivera-Serrano et al.,

2012) y de membrana vacuolar, la cual en plantas es llamada tonoplasto (δ -TIP; Nelson et al, 2007). Estos marcadores fueron transformados de manera transitoria en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, luego las células de los cotiledones fueron observados mediante microscopía confocal (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM). Posteriormente, se comparó la estructura del retículo endoplasmático y de la membrana vacuolar de plantas silvestres y de plantas de las líneas mutantes insercionales de los factores de transcripción seleccionados bZIP25, bZIP28 y MYC3.

El análisis de la morfología del retículo endoplasmático de la zona cortical de la célula epidermales de hojas de plantas de 6 días de *Arabidopsis thaliana* permitió identificar 4 diferentes estructuras del retículo endoplasmático. Una estructura de retículo endoplasmático, estructura tipo 1, caracterizada por la presencia de túbulos y cisternas (Figura 13A), una segunda estructura, estructura tipo 2, que presenta una red reticulada de túbulos, sin cisternas (Figura 13B), un tercer tipo de estructura de retículo endoplasmático, estructura tipo 3, que presenta cisternas de gran tamaño que es denominada Fenotipo 3 (Figura 13C) y por último una estructura que es caracterizada por presentar túbulos más cortos o contraídos que es llamada estructura tipo 4 (Figura 13D). Tanto las estructuras de retículo endoplasmático tipo 1 y 2 han sido previamente descritas en células de plantas silvestres que expresan el marcador de retículo HDEL-GFP (Sparkes et al., 2009; Tolley et al., 2010). Mientras que estructuras similares a las clasificadas como del tipo 3 y 4 han sido encontradas en células de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *PAH1* y *PAH2*, estos genes codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos y en células de plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresan a las proteínas reticulon (RTN), las cuales

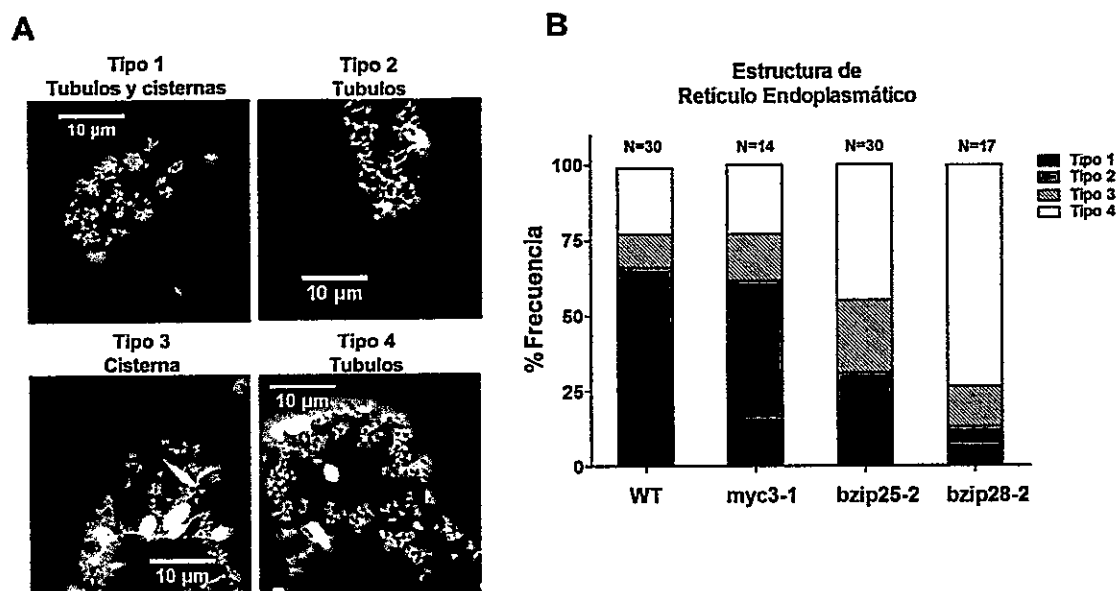


Figura 13: Análisis de la estructura del retículo endoplasmático de mutantes insercionales de factores de transcripción seleccionados

La estructura del retículo endoplasmático fue analizada a través de la visualización por microscopía confocal (LSCM) del marcador mCherry-HDEL, el cual transformado transitoriamente en cotiledones de plántulas de *Arabidopsis thaliana* silvestres, *myc3-1*, *bzip25-2*, *bzip28-2*. **A)** Imágenes representativas de la clasificación de los tipos de estructura del retículo endoplasmático: estructura del tipo 1 caracterizada por presentar una red reticulada con cisternas; estructura del tipo 2 correspondiente a una red reticulada carente de cisternas; estructura del tipo 3 la cual se caracteriza por presentar cisternas grandes; y estructura del tipo 4 la es una red reticulada con túbulos contraídos. **B)** Frecuencia de observación de cada tipo de estructura del retículo endoplasmático en las líneas analizadas: silvestre (WT), *myc3-1*, *bzip25-2* y *bzip28-2*, presentado como un porcentaje del total de células observadas. Para cada experimento se analizaron 3 plantas, lo que se realizó en triplicado para las líneas WT y *bzip25-2* y en duplicado para *myc3-1* y *bzip28-2*. N: número total de células analizadas. Barra = 10 μm . Análisis de estadístico de χ^2 muestra que todas las distribuciones del porcentaje de frecuencia son diferentes $p < 0,001$.

modifican la curvatura de los túbulos del retículo endoplasmático (Tolley et al., 2010; Sparkes et al; 2010). La estructura de retículo endoplasmático de las células de las plantas silvestre presenta preferentemente la estructura de retículo endoplásmico del tipo 1 y 2 (figura 13), lo cual coincide con la estructura de retículo endoplasmático descrito para plantas silvestres (Sparkes at al., 2009; Tolley et al., 2010). El análisis de estructura de retículo endoplasmático de la mutante homocigota *myc3-1* muestra que las células de esta planta presentan una distribución de estructura distinta a la de la planta silvestre siendo la estructura del tipo 2 la más abundante (Figura 13). Sin embargo, si consideramos que la estructura del tipo 1 y 2 han sido descritas como estructura de plantas silvestres, consideramos que la estructura de retículo endoplasmático de la mutante *myc3-1* es silvestre, pese a que la distribución de estructura es distinta a la observa en nuestros experimentos en la planta silvestre (χ^2 , $p < 0,001$). La mutante *myc3-1* presenta la inserción de T-DNA en la primera porción del único exón del gen MYC3 y es considerada para este análisis como una mutante deficiente de MYC3 (Figura 13). Sin embargo, es necesario verificar esto mediante la cuantificación del nivel de transcrito de *MYC3* y la acumulación del producto génico para corroborar la deficiencia de MYC3. Considerando a la mutante *myc3-1* como una línea deficiente del factor de transcripción MYC3, el resultado nos indica que la pérdida de función de MYC3 no provoca alteraciones en este compartimento, y con ello que este factor de transcripción no estaría involucrado en la regulación de arquitectura y mantención del retículo endoplasmático (Figura 13).

También fue analizada la participación del factor de transcripción bZIP28 en la localización del marcador de retículo endoplásmico y en la estructura del retículo se utilizó una línea mutante insercional homocigota *bzip28-2*, previamente caracterizada

como una mutante de pérdida de función del factor de transcripción bZIP28 (Figura 13, Liu et al., 2007). A su vez analizamos la participación del factor de transcripción bZIP25 utilizando una línea mutante homocigota *bzip25-2*, la cual es una mutante deficiente de bZIP25 (Figura 12). Esta línea presenta la inserción de T-DNA en el primer exón del gen y una disminución del transcrito de bZIP25 superior al 90% respecto a una planta silvestre (Figura 13). En el análisis de ambas líneas mutantes observamos que las células de estas plantas presentan preferentemente una estructura de retículo endoplasmático del tipo 4. Adicionalmente, la mutante *bzip25-2* presenta una mayor frecuencia de la estructura de retículo endoplasmático del tipo 3 que las otras líneas analizadas incluyendo a la planta silvestre (Figura 13). En conjunto estos resultados nos indican que tanto bZIP25 como bZIP28 tendrían un rol en el establecimiento y/o mantención de la estructura del retículo endoplasmático y, de esta forma, en su funcionamiento. Interesantemente, existirían diferencias en las funciones que cumplen bZIP28 y bZIP25, ya que el retículo endoplasmático de este último factor de transcripción presenta una mayor frecuencia de la estructura del tipo 3. El fenotipo alterado del retículo endoplasmático presente en la mutante *bzip28-2* es consistente con la caracterización previa de bZIP28 como un regulador del estrés de retículo endoplasmático (Liu et al, 2007; Tajima et al, 2008). Sin embargo, este fenotipo alterado no había sido descrito previamente en esta línea mutante. Respecto a la localización del marcador proteico de retículo endoplasmático observamos que este fue correctamente localizado en todas las líneas analizadas, por lo tanto, ninguno de estos factores de transcripción estaría participando en la destinación de esta proteína, descartando la participación de ellos en la regulación del tráfico a este nivel.

Es importante destacar que estos análisis muestran por primera vez que bZIP25 está involucrado en la regulación de la morfología y/o mantenimiento de la estructura del retículo endoplasmático, cobrando relevancia por la novedad implícita en la caracterización de bZIP25 como un regulador del funcionamiento del sistema de endomembrana y un putativo regulador del tráfico. Por esto decidimos profundizar en el estudio de este factor de transcripción, dejando a los otros factores de transcripción candidatos para posteriores estudios. Como fue descrito anteriormente, *bzip25-1* presenta una mutación insercional en la región 5' no traducible, mientras que *bzip25-2* presenta la mutación insercional interrumpiendo la región codificante del primer exón del gen *bZIP25*. (Figura 12A). El genotipo homocigoto para el alelo mutante de las líneas *bzip25-1* y *bzip25-2* fue verificado mediante PCR (figura 12B) y los niveles de transcrito de bZIP25 en estas mutantes fue determinado mediante RT-qPCR donde se obtuvo que *bzip25-1* no presenta cambios estadísticamente significativos de los niveles de transcrito de *bZIP25*, mientras que *bzip25-2* muestra una fuerte disminución de los niveles de transcrito de este factor de transcripción, por lo que es considerada como una mutante deficiente de bZIP25 en los análisis posteriores (Figura 12C).

Para continuar con la caracterización de bZIP25 analizamos el efecto de la pérdida de función en la estructura de la vacuola a través de la visualización de un marcador proteico de membrana vacuolar mediante microscopía confocal (LSCM). El marcador fue transformado de manera transitoria en cotiledones de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo silvestre, *bzip25-1* y *bzip25-2*. En este análisis observamos que las células de las plantas silvestres presentan dos tipos de estructura de la vacuola. La más frecuente se caracteriza por presentar el marcador extendido por la membrana de la vacuola, tonoplasto, cercana a los límites de la célula y es llamada

estructura del tipo 1 (Figura 14). Mientras que la segunda estructura el marcador también se encuentra en el interior de la vacuola en estructuras circulares/alargadas que es denominada estructura del tipo 2 (Figura 14). Ambos tipos de estructura vacuolares han sido observadas previamente utilizando este marcador de la membrana vacuolar y otros marcadores proteicos de este compartimento (Nelson et al., 2007; Agee et al., 2009). En las células de las plantas mutantes *bzip25-2* se encontró una tercera estructura de la vacuola caracterizada por la presencia de numerosas estructuras internas circulares/alargadas y agregadas a lo largo de toda la célula, esto puede ser observado en los distintos planos del eje-Z y es llamada estructura de tipo 3 (Figura 14). Estructura de la vacuola similar a esta han sido encontradas en mutantes de *Arabidopsis thaliana* como en *modified vacuole phenotype 1,.mvp1-1* (Agee et al., 2010).

El estudio de la estructura de la vacuola muestra que no hay diferencia en la frecuencia de distribución de tipos de estructura de la vacuola entre la planta silvestre y la mutante *bzip25-1*, lo cual es consistente con que tampoco hay diferencia entre los niveles de transcritos de *bZIP25* de estas dos líneas (Figura 14). Por otra parte, la frecuencia de distribución de los tipos de estructura de la vacuola es diferente entre la línea deficiente de *bZIP25*, *bzip25-2*, y la línea silvestre, donde resalta la aparición de un tercer fenotipo que posee abundantes estructuras membranosas internas (Figura 14). Estos resultados indican que la deficiencia de la expresión de *bZIP25* induce un cambio en la estructura vacuolar sugiriendo una alteración en el funcionamiento del sistema de endomembrana y, en particular, en la estructura, tráfico y/o mantenimiento de la vacuola. En mamíferos se ha descrito un factor de transcripción, llamado TFEB, el cual participa en la regulación de la biogénesis y funcionamiento del lisosoma,

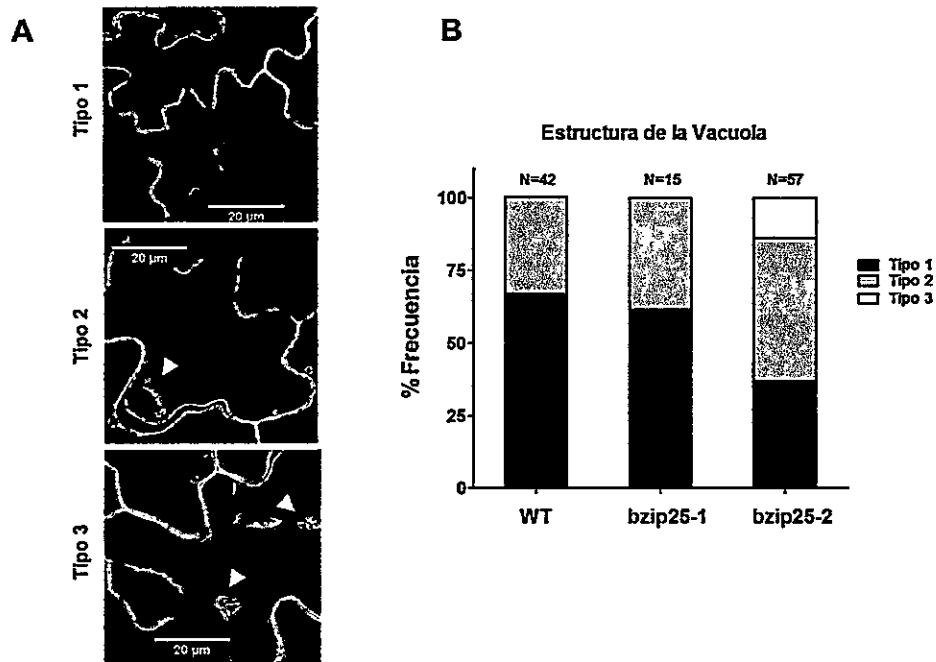


Figura 14: Análisis de la estructura de la vacuola en mutantes insercionales del factor de transcripción bZIP25.

La estructura de la vacuola fue analizada mediante la visualización por microscopía confocal (LSCM) del marcador de tonoplasto δ -TIP-GFP, el cual transformado transitoriamente en cotiledones de plántulas de *Arabidopsis thaliana* silvestres, *bzip25-1* y *bzip25-2*. **A)** Imágenes representativas de la clasificación de los tipos de estructura de vacuola: estructura del tipo 1 que se caracteriza porque el marcador está localizado cercano al contorno celular; estructura del tipo 2, donde el marcador además de estar localizado cercano al contorno celular, está presente en estructuras internas circulares/alargadas (punta de flecha); estructura del tipo 3 que se caracteriza por una alta abundancia de estructuras internas circulares/alargadas que presentan el marcador de vacuola (punta de flecha). **B)** Frecuencia de observación de cada tipo de estructura de la vacuola en las líneas analizadas: silvestre (WT), *bzip25-1* y *bzip25-2*. Para cada experimento se utilizaron 3 plantas, lo que se realizó en triplicado para las líneas WT y *bzip25-2* y en duplicado para *bzip25-1*. N: número total de células analizadas. Barra = 20 μ m. Análisis de estadístico de χ^2 muestra que todas las distribuciones del porcentaje de frecuencia son diferentes $p < 0,001$.

un compartimento del sistema de endomembrana de células animales que puede ser considerada análogo a la vacuola de las plantas, así como procesos autofágicos y de exocitosis lisosomal (Sardiello et al, 2009; Settembre et al, 2011; Medina et al, 2011). En plantas hasta la fecha no se ha descrito un factor de transcripción involucrado en la regulación de la morfología o funcionamiento de la vacuola, por lo que este sería la primera vez en que se reporta esta regulación.

En conjunto, el análisis de la localización de estos dos marcadores proteicos de retículo endoplasmático y de la vacuola, nos indican que el factor de transcripción bZIP25 estaría participando en la mantención y/o establecimiento de la estructura y posiblemente en el funcionamiento de estos compartimentos así como de las vías de tráfico que tienen como compartimentos de origen o destino al retículo endoplasmático y la vacuola. En base a estos resultados, bZIP25 se muestra como un candidato prometedor para regular la transcripción de genes de tráfico y el tráfico de proteínas a través del sistema de endomembrana.

Considerando que el fenotipo observado a nivel de vacuola en la mutante *bzip25-2* puede ser debido a una alteración en la regulación del tráfico a vacuola mediada por bZIP25 como ha sido descrito en mutantes de componentes de la maquinaria de tráfico (Agee et al., 2010). Esta posible regulación transcripcional del tráfico a vacuola es un proceso novedoso en eucariontes y no descrito en plantas por lo que sería de altísima importancia estudiar la regulación de las vías de tráfico relacionadas con este compartimento. A través de las vías endocíticas que se dirigen a la vacuola convergen las dos rutas de tráfico de una célula vegetal, estas son la ruta endocítica y secretoria (Figura 1). En esta tesis nos hemos enfocado a estudiar el rol de bZIP25 en el tráfico hacia la vacuola para lo cual utilizamos el trazador fluorescente

de membrana FM4-64 y su tráfico a través de la ruta endocítica en líneas deficientes de bZIP25.

3.3.2 Estudio de la dinámica de internalización de membrana plasmática a través de vías endocíticas y su relación con la función del factor de transcripción bZIP25.

El rol de bZIP25 en el funcionamiento de las vías de tráfico hacia la vacuola se estudió mediante el análisis del efecto de la pérdida de función de bZIP25 en la internalización de la membrana plasmática y su tráfico hasta la vacuola, a través del análisis la dinámica de incorporación de la membrana plasmática marcada con el trazador de membrana FM4-64 por microscopía confocal (Figura 15). Para realizar este experimento se inhibió la endocitosis incubando las plantas en hielo y en esta condición fue teñida la membrana plasmática con el trazador FM4-64. Luego las plantas fueron transferidas a temperatura ambiente para cesar la inhibición la endocitosis permitiendo que el trazador unido a la membrana sea internalizado. Se analizó la internalización de la membrana marcada a 5, 30 y 90 minutos de internalización, donde se considera como tiempo 0 el momento en que las plantas son transferidas a temperatura ambiente. En este análisis observamos que la membrana marcada proveniente de la membrana plasmática alcanza estructuras de morfología endosomal en la línea *bzip25-2* deficiente de bZIP25 luego de 5 minutos de internalización del trazador unido a la membrana, mientras que la planta silvestre solo presenta una leve tinción de este tipo de estructura (Figura 15). Esto indica que el tráfico desde la membrana plasmática a los endosomas está acelerado, lo cual es consistente con lo observado a 30 minutos de internalización de la membrana

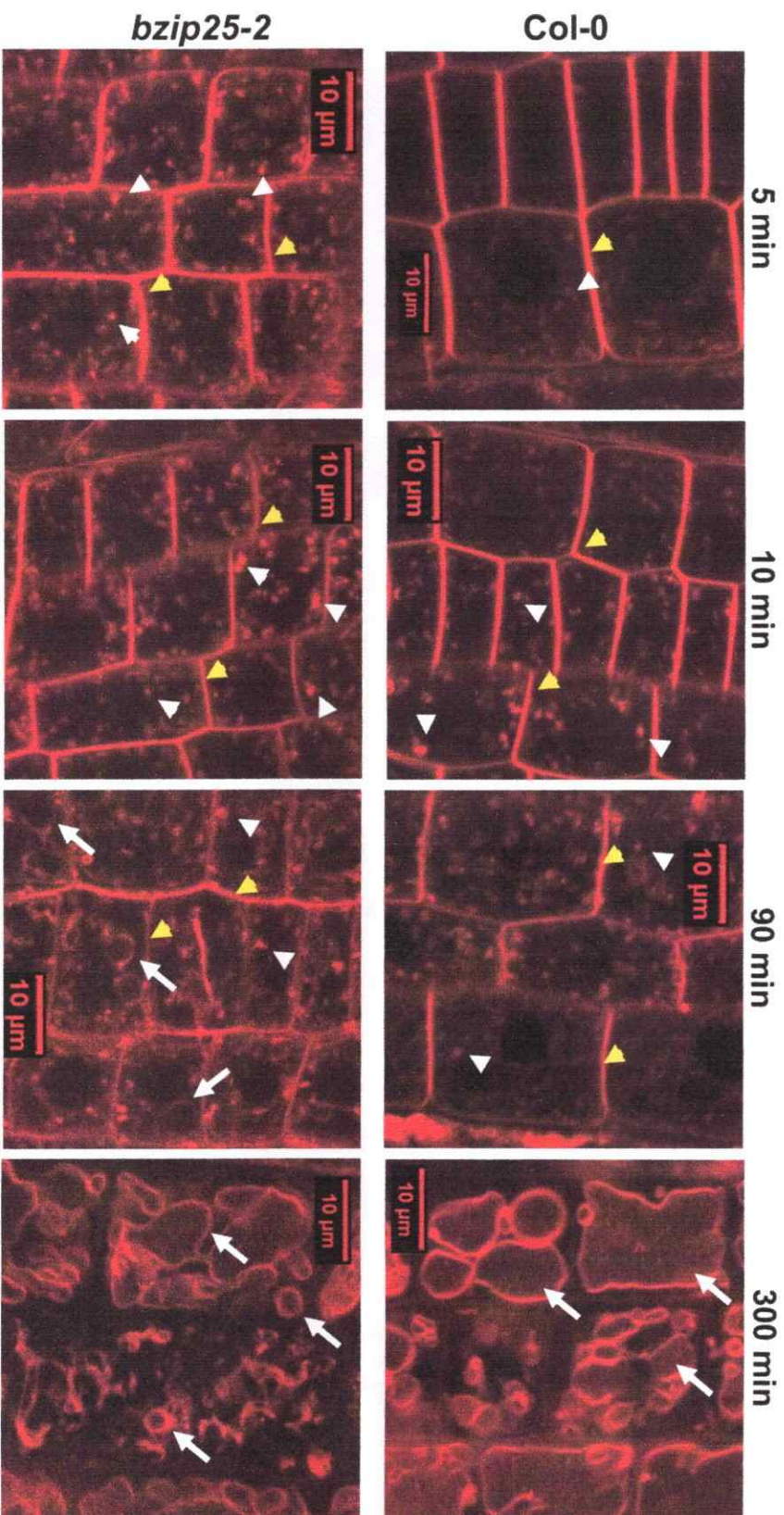


Figura 15: Análisis de la dinámica de internalización de membrana plasmática en células de la raíz de plantas deficientes de *bZIP25*.

Análisis de la dinámica de internalización del trazador de membrana plasmática FM4-64 unido a esta membrana en células de la punta de la raíz de plantas *bzip25-2* y silvestres (Col-0) de 10 días de *Arabidopsis thaliana*, mediante microscopía confocal (LSCM). Se muestran imágenes representativas. Se indica con punta de flecha amarilla la membrana plasmática,

con punta de flechas blancas la estructura de tipo endosomal y con flechas blancas las estructura de tipo vacuolar. En la planta silvestre a 5 minutos de iniciada la internalización de la membrana marcada se observa que esta se encuentra principalmente en la membrana plasmática, mientras que en la línea *bzip25-2* se observa que la membrana marcada marca la membrana plasmática y también en estructuras endosomales. A 10 minutos de iniciada la internalización de la membrana marcada se observa que esta membrana se encuentra en la membrana plasmática y en estructuras endosomales, tanto en la planta silvestre como en la línea *bzip25-2*. Luego de 90 minutos de internalización, la membrana marcada se observa en la membrana plasmática y estructuras endosomales en la planta silvestre y en la línea *bzip25-2*, sin embargo, en esta línea también se observa que la membrana marcada alcanza estructuras de tipo vacuola. A 300 minutos se observa que la membrana marcada alcanza la vacuola en ambas líneas de plantas. Experimento realizado por triplicado. Barra de tamaño = 10 μm .

marcada, donde la planta *bzip25-2* presenta estructuras tipo endosomas de mayor tamaño y altamente teñidas, comparado con esta misma línea a tiempo 5 minutos y que los que presenta la planta silvestre a 30 minutos de internalización de la membrana marcada. A 90 minutos de internalización de la membrana marcada se observa que en la línea *bzip25-2* la membrana marcada ha alcanzado estructuras de morfología vacuolar, tiñendo su membrana, mientras que la planta silvestre no se observa la tinción de estas estructuras (Figura 15). La comparación de la dinámica de endocitosis de la línea *bzip25-2* y la línea silvestre en los tiempos entre 5 a 90 minutos de internalización muestra que la tasa de tráfico a través de la vía endocítica está acelerada en la línea deficiente de bZIP25, indicando que este factor de transcripción sería un regulador negativo del tráfico endocítico.

Adicionalmente, se observó la internalización de la membrana marcada de membrana plasmática hasta la vacuola, el compartimento final de la ruta endocítica luego de 300 minutos de internalización de la membrana marcada (Figura 15). Aquí se observó que tanto en la planta silvestre como en la mutante *bzip25-2* la membrana marcada alcanza la vacuola marcándola completamente. Sin embargo, la estructura de este compartimento es diferente entre en la línea deficiente de bZIP25 respecto a la planta silvestre. Se observa que la línea *bzip25-2* presenta una vacuola más segmentada, menos fusionada, con estructuras de menor tamaño, lo cual es comparable a lo observado en las células de la epidermis de cotiledones donde se observa un mayor número de estructuras internas (Figura 14). Estos resultados reafirman la participación de bZIP25 en la regulación de la morfología de la vacuola e indican que el tráfico a través de la ruta endocítica sería regulado por este factor de transcripción y que esta regulación podría tener una implicancia en el fenotipo alterado

de la vacuola. Particularmente, la aceleración del tráfico de la membrana marcada de membrana plasmática hacia la vacuola sugiere que bZIP25 actuaría como un regulador negativo de la endocitosis.

El efecto celular de la alteración de vías de tráfico en la mutante deficiente de bZIP25 fue estudiado utilizando la droga BFA, un inhibidor del reciclaje endocítico (Figura 1), a través de la internalización del trazador FM4-64 unido a la membrana, la cual es visualizada por microscopia confocal. Para realizar este experimento se inhibió la endocitosis en hielo y en esta condición fue teñida la membrana plasmática con el trazador FM4-64 en presencia de BFA (BFA 50 μ M). Luego las plantas teñidas fueron incubadas en presencia de BFA y transferidas a temperatura ambiente para dar inicio a la internalización de la membrana plasmática (tiempo 0) y se realizó la adquisición de imágenes de manera progresiva durante un periodo de 240 minutos. Como fue mencionado anteriormente, tratamientos con el inhibidor del reciclaje endocítico BFA, provoca la acumulación de membrana y proteínas endocitadas desde la membrana plasmática en TGN/EE y la consiguiente aglomeración de estos compartimentos en el llamado cuerpo de BFA. De tal forma que cuando la endocitosis esta acelerada se observa la aparición a tiempos más cortos del cuerpo de BFA. Por lo tanto el uso de esta droga nos permite por una parte estudiar la respuesta celular a la inhibición mediada por BFA de la línea mutante deficiente de bZIP25, así como verificar la aceleración de la endocitosis en esta planta y por lo tanto el rol de bZIP25 como un regulador negativo de la endocitosis.

En este análisis observamos que en las células de la planta mutante *bzip25-2*, luego de 30 minutos de internalización de la membrana marcada, se observan cuerpos

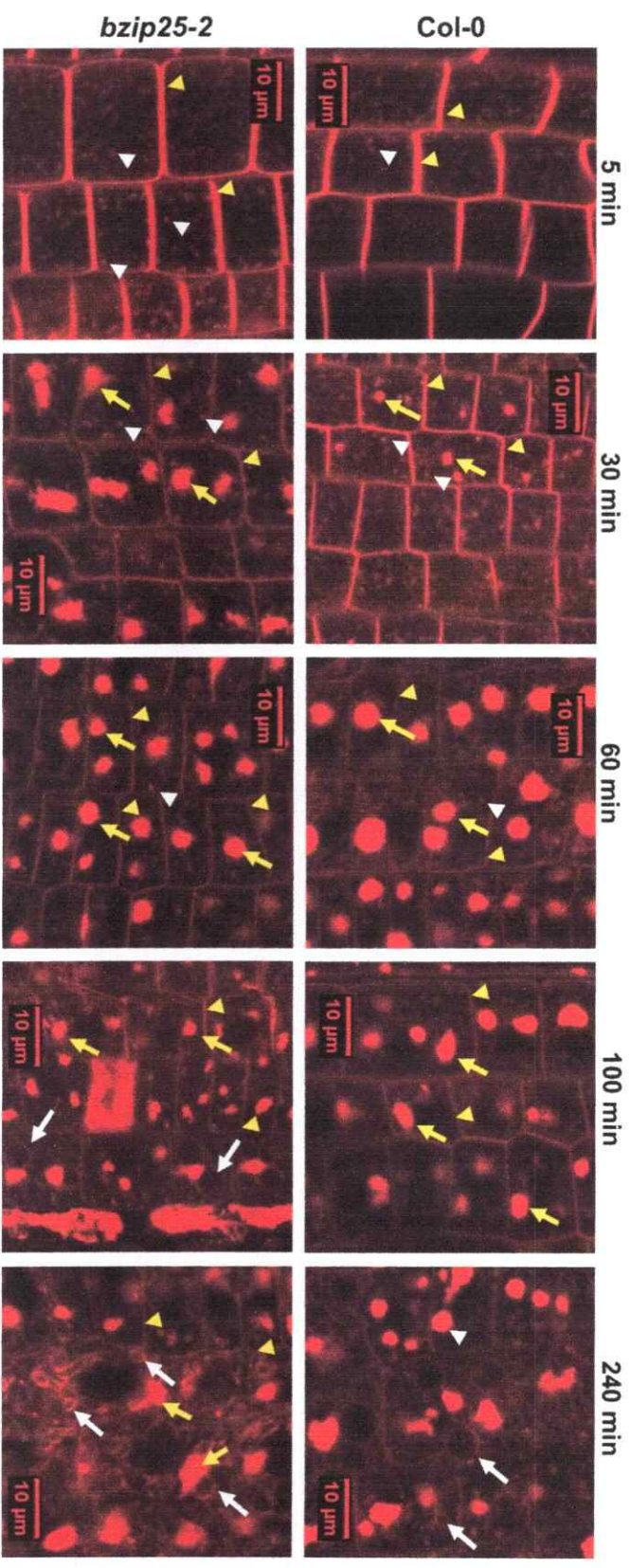


Figura 16: Efecto celular de la alteración de vías de tráfico endocíticas mediada por BFA en células de la punta de la raíz de plantas deficientes de bZIP25.

Análisis de la dinámica de internalización del trazador de membrana plasmática FM4-64 unido a esta membrana en células de la punta de la raíz de plantas *bzip25-2* y silvestres (Col-0) de 10 días de *Arabidopsis thaliana* tratadas con el inhibidor de vías de tráfico BFA (50 µM) mediante microscopía confocal (LSCM). Se indica con puntas de flechas amarillas la membrana plasmática, con puntas de flechas blancas estructuras endosomas, con flechas amarillas los cuerpos de BFA y con flechas blancas los cuerpos tipo vacuolas. A 5 minutos de internalización de la membrana plasmática marcada se observa que esta está principalmente en la membrana plasmática en la línea silvestre, mientras que en la línea *bzip25-2* se encuentra en la membrana plasmática y también en estructuras endosomales. A 30 minutos de internalización se

observa la membrana marcada en la membrana plasmática y marcando pequeños cuerpos de BFA en la línea silvestre, en la línea *bzip25-2* se observa la membrana marcada en la membrana plasmática y en cuerpos de BFA de gran tamaño. Luego de 60 min, la membrana marcada se encuentra marcando la membrana plasmática y los cuerpos de BFA en ambas líneas, donde se observa que la línea silvestre presenta un cuerpo de gran tamaño mayor que el observado en este tiempo para la planta *bzip25-2*. De manera similar a 100 de internalización de la membrana marcada se observa que la línea silvestre presenta un cuerpo de BFA marcado que es de mayor tamaño que la línea *bzip25-2*, sin embargo en esta línea se observa que la membrana marcada alcanza estructuras de tipo vacuolar. A 240 minutos de iniciada la internalización de la membrana marcada se observa que esta está presente tanto el cuerpo de BFA como la membrana plasmática en la planta silvestre y mutante, y que en ambos genotipos la membrana marcada ha alcanzado estructuras de tipo vacuolar. Este fenómeno es más notorio en la línea *bzip25-2* que presenta mayor marcaje de estructuras distintas al cuerpo de BFA que la línea silvestre. Experimento realizado en triplicado. Barra = 10 μm .

de BFA de mayor tamaño que en la planta silvestre (Figura 16). Este resultado indica que la endocitosis efectivamente esta acelerada en la línea deficiente de bZIP25. A 60 minutos de internalización se observan cuerpos de BFA de tamaño similar o de menor tamaño en línea *bzip25-2* que en la célula de la planta silvestre en el mismo tiempo de tratamiento, esto sugiere mayor tráfico de componentes a compartimentos posteriores al cuerpo de BFA en la línea deficiente de bZIP25 (Figura 16). Luego de 100 minutos de internalización de la membrana marcada de membrana plasmática en la planta deficiente de bZIP25 se observa que la membrana marcada ha alcanzado la membrana de la vacuola y presenta cuerpos de BFA de menor tamaño, mientras que en las células de la planta silvestre la membrana marcada no ha alcanzado la vacuola, reforzando la idea que indica que la planta deficiente de bZIP25 presenta acelerado el tráfico post-cuerpo de BFA, por lo tanto el tráfico post-TGN/EE a vacuola (Figura 16). En el último tiempo analizado a 240 minutos de internalización de la membrana marcada se observa que la membrana marcada ha alcanzado la membrana de la vacuola en ambos genotipos, silvestre y *bzip25-2* (Figura 16). De manera concordante a lo observado a otros tiempos la línea *bzip25-2* presenta un mayor número de estructuras tipo vacuola marcadas con el trazador, lo que es consistente con la aceleración del tráfico a vacuola observado a otros tiempos de internalización del marcador.

Es interesante observar que la internalización de la membrana marcada de membrana plasmática a 30 minutos en la planta *bzip25-2* es similar al observado en las células de la planta silvestre a 60 minutos, de manera consistente la internalización de la membrana marcada a luego de 60 minutos en las células de la planta silvestre es similar a la presentada por la planta silvestre a 100 minutos (Figura 16). Estos

resultados nos muestran que en la línea *bzip25-2* el efecto de la droga sobre la internalización de la membrana marcada de membrana plasmática esta adelantado o acelerado respecto a la planta silvestre, indicando que a pesar de que ambas plantas son sensibles a la droga existe una dinámica de la respuesta celular a esta droga que es diferente en la mutante deficiente de *bZIP25* respecto a la respuesta de la planta silvestre. La formación de un gran cuerpo de BFA a 30 minutos sugiere una aceleración de la endocitosis de la membrana plasmática hacia los endosomas y la llegada de la membrana marcada a la vacuola a menor tiempo de internalización en la línea mutante que en la silvestre, lo que indica que la vía endocítica desde endosomas a vacuola también estaría acelerada (Figura 16). Estos resultados son concordantes a lo previamente observado en la dinámica de endocitosis donde se observa que el tráfico de la membrana marcada desde la membrana plasmática a vacuola esta acelerado (Figura 15).

Para corroborar la alteración de la ruta endocítica en cuanto a la aceleración del tráfico hacia la vacuola analizamos el efecto celular de la inhibición de otra vía endocítica utilizando el compuesto químico Wortmanina (Wm), una droga que inhibe el tráfico endocítico desde endosomas tardíos o MVB/PVC a la vacuola (Figura 1). Wm es una droga que inhibe a las fosfatidilinositol kinasas PI3K y PI4K evitando la fosforilación de lípidos de la membrana y de esta forma impide la interacción de proteína con dominios FYVE con la membrana (Gaulhier et al, 1998; Vermeer et al, 2006). Uno de los efectos mejor caracterizados de Wm es la inhibición del tráfico desde el MVB/PVC y a la vacuola, donde por efecto de esta droga proteínas con dominios FYVE no podrían interactuar con la membrana de este compartimento, alterando la función y estructura de MVB/PVC (da Silva et al, 2005; Pimpl et al, 2006). Esta

alteración del funcionamiento del MVB/PVC provoca un cambio de la morfología de este compartimento que puede ser visualizado en microscopía confocal como anillos de membrana que corresponde al compartimento prevacuolar "hinchado" ("swelling of prevacuolar compartment", Wang et al, 2009).

De manera similar al estudio del efecto de la inhibición mediada por BFA, el análisis del efecto de Wm se realizó inhibiendo la endocitosis en hielo seguida de la tinción con el trazador FM4-64 de membrana plasmática en presencia de Wm (33 μ M). Luego la internalización de la membrana marcada fue seguida de manera progresiva mediante microscopía confocal desde que las plantas fueron transferidas a temperatura ambiente, momento en el que se da inicio a la internalización de la membrana marcada (tiempo 0), hasta 90 minutos de internalización de la membrana plasmática periodo en el cual se mantuvo el tratamiento con Wm (Figura 17). En este análisis observamos que en plantas silvestres en tratamiento con Wm luego de 30 minutos de internalización de la membrana marcada de membrana plasmática, la membrana marcada está presente en endosomas y estructuras tipo anillo características del tratamiento con este inhibidor, los cuales son llamados anillos de Wm (Figura 17). En las células de la línea deficiente de bZIP25, *bzip25-2*, se observan estas estructuras con menor frecuencia que en la planta silvestre y se observan endosomas de mayor tamaño. Este resultado evidencia que la planta *bzip25-2* tiene acelerada la endocitosis de la membrana marcada mostrando un efecto distinto de esta droga sobre la línea deficiente de bZIP25 que en la planta silvestre. A este tiempo también se observa que la membrana marcada ha alcanzado algunas estructuras de tipo vacuolar en las células de la línea *bzip25-2*, mientras que en las plantas silvestres no se observa este fenómeno. A 90 minutos de internalización de la membrana

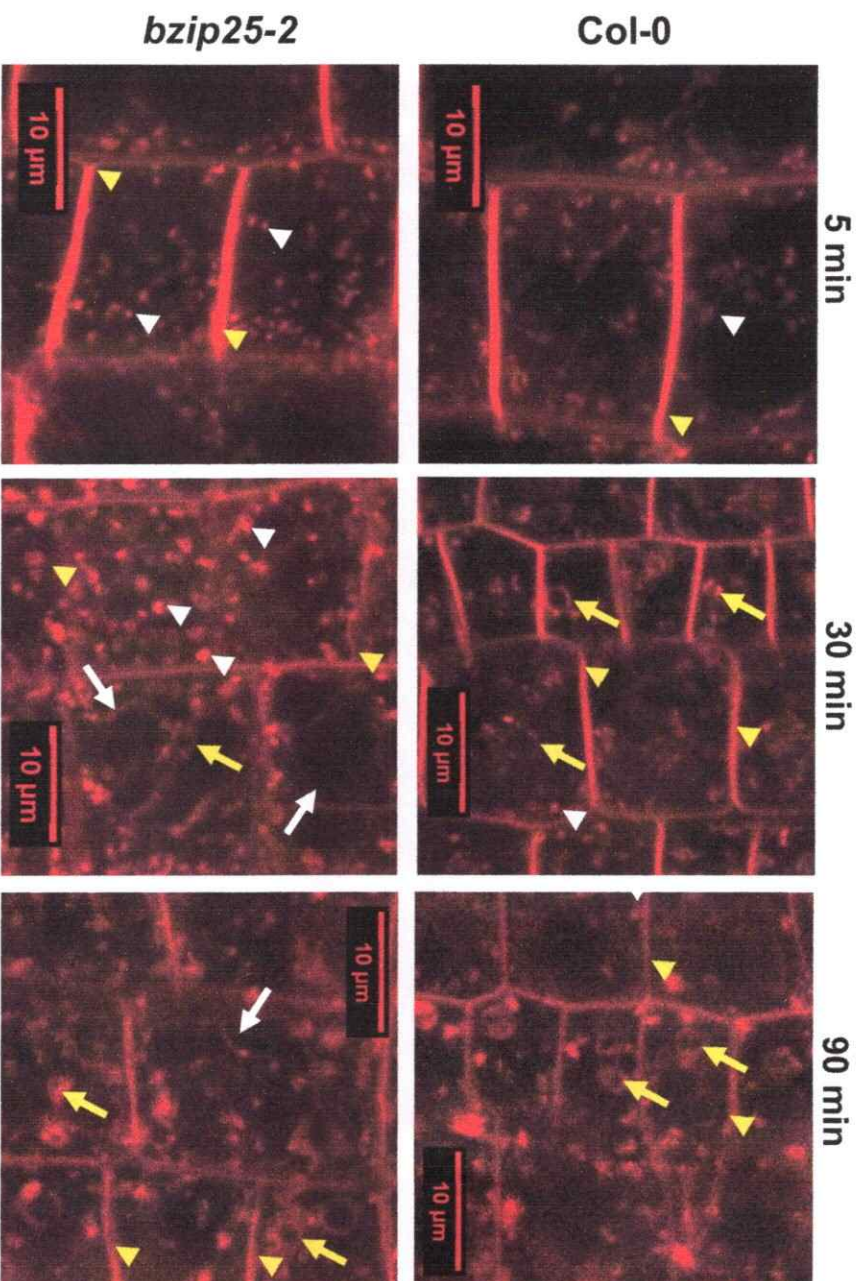


Figura 17: Efecto celular de la alteración de vías de tráfico endocíticas mediada por Wm en células de la punta de la raíz de plantas deficientes de *bZIP25*.

Análisis de la dinámica de internalización del trazador de membrana plasmática FM4-64 unido a esta membrana en células de la punta de la raíz de plantas *bzip25-2* y silvestres (Col-0) de 10 días de *Arabidopsis thaliana* tratadas con el inhibidor de vías de tráfico Wm (33 μM) mediante microscopía confocal (LSCM). Se muestran imágenes representativas del efecto de

Wm (33 μM) en células de la punta de la raíz de plantas mutantes y silvestres. Se indica con puntas de flechas amarillas la membrana plasmática, con puntas de flechas blancas estructuras endosomas, con flechas amarillas blanca las estructuras con forma de anillos descritas como parte del efecto típico de Wm en plantas silvestres y con flechas blancas los cuerpos tipo vacuolas. A 5 minutos de internalización de la membrana plasmática marcada con el trazador se observa que esta membrana marcada se encuentra principalmente en la membrana plasmática y en estructuras endosomales en la planta silvestre como en la línea *bzip25-2*. En esta última se observa mayor tinción de estructuras endosomales. Luego de 30 minutos de incubación se observa que la membrana plasmática marcada está presente en estructuras endosomales y en la membrana plasmática en ambas plantas. Adicionalmente, el la membrana marcada se encuentra marcando estructuras tipo anillo características del tratamiento con Wm en la planta silvestre. Este tipo de estructura se observa con menor frecuencia en la línea *bzip25-2*. A 90 minutos de internalización de la membrana plasmática marcada se observa que en la línea *bzip25-2* se encuentra marcada la membrana plasmática y que la membrana marcada ha alcanzado estructuras vacuolares, mientras que la línea silvestre la membrana marcada no ha alcanzado la vacuola y se encuentra en estructuras de tipo anillo y en la membrana plasmática. Experimento realizado en triplicado. Barra = 10 μm .

marcada se observa un mayor número de anillos de Wm en la planta silvestre y en algunas células el trazador alcanza la membrana de la vacuola. En la planta *bzip25-2* a 90 minutos se observa que aumenta la presencia de anillos de Wm, de manera similar a lo que ocurre en la planta silvestre a 30 minutos. Esto nos indica que la mutante *bzip25-2* responde de manera retardada a Wm, lo que nos sugiere que la vía endocítica inhibida por esta droga esta acelerada, o más activa, en esta línea mutante lo cual se soporta en el hecho que la membrana marcada alcanza la vacuola a los 30 minutos mientras que en la planta silvestre no lo hace. Este análisis soporta, a través del uso de otra droga que inhibe el tráfico endocítico desde el MVB/PVC a la vacuola, que el tráfico de membrana plasmática a la vacuola esta acelerado en la mutante deficiente de bZIP25 mostrando el papel de bZIP25 como un regulador negativo de la ruta endocítica.

Considerado que en la línea deficiente de bZIP25 existe una alteración en el funcionamiento de las vías de tráfico desde la membrana plasmática a la vacuola analizamos el efecto de estas drogas en la planta completa a través de la medición del crecimiento de plantas silvestres y *bzip25-2*. Para esto se cultivaron *in-vitro* estas plantas en un medio de cultivo suplementado con BFA o Wm se midió la tasa de germinación y el crecimiento de la raíz principal como parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas (Figura 18). En este análisis observamos que las plantas de la línea deficiente de bZIP25, *bzip25-2*, presentan un mayor crecimiento que la planta silvestre en respuesta a BFA y Wm (18B y 18E), mientras que la tasa de germinación y el desarrollo temprano de la planta se ve afectado en respuesta a Wm y pero no en respuesta a BFA (Figura 18D y 18F). Como es esperado la línea *bzip25-1* que no presenta diferencia en los niveles de transcrito de *bZIP25* (Figura 13), se comporta de

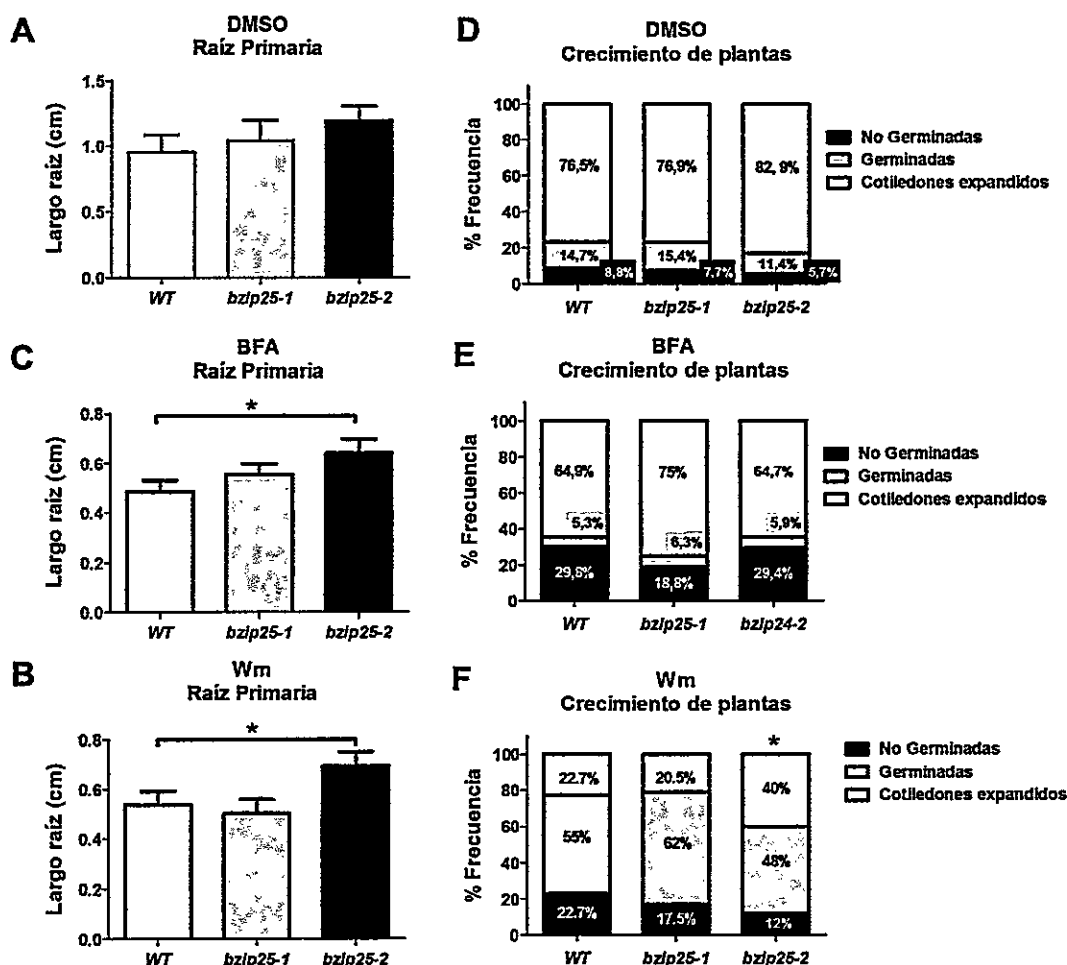


Figura 18: Efecto fisiológico de la alteración de vías de tráfico endocíticas mediada por BFA y Wm en líneas mutantes de bZIP25.

Se analizó el largo de la raíz principal y la capacidad germinativa de las líneas *bzip25-1*, *bzip25-2* y líneas silvestres (Col-0) de *Arabidopsis thaliana* como parámetros fisiológico del efecto de la alteración de vías de tráfico endocítico mediado por BFA y Wm en plántulas de 5 días sembradas y cultivadas en medio suplementado con BFA 10 μ M, Wm 33 μ M y DMSO (condición control). Se determinó el largo de la raíz principal en plántulas de las líneas *bzip25-1*, *bzip25-2* y líneas silvestres de *Arabidopsis thaliana* en los tratamientos control (A), BFA (B), Wm (C). El largo de raíz fue cuantificado utilizando el programa tpsdig2. La germinación y el desarrollo temprano de la plántula fue expresado como un porcentaje de frecuencia de semillas no germinadas, semillas germinadas y arrestadas y plántulas con cotiledones expandidos en tratamiento control (D), BFA (E), Wm (F). Los experimentos fueron realizados en triplicado.

la misma forma que la planta silvestre (Figura 18), indicado que la diferencia entre *bzip25-2* y la planta silvestre se debe a la deficiencia de bZIP25. En la condición control no se observan diferencias para ninguno de los dos parámetros observados, sugiriendo que el efecto observado se produce a una diferencia entre la línea *bzip25-2*, *bzip25-1* y la línea silvestre en respuesta a las drogas (Figura 18A y 18B). Este resultado nos indica que la mutante *bzip25-2* es sensible a ambas drogas. Sin embargo, la línea *bzip25-2* presenta una sensibilidad menor a ellas que la línea silvestre, lo cual se correlaciona con la respuesta diferencial a BFA y Wm que fue observado a nivel celular (Figura 16). De tal forma que el tráfico endocítico acelerado desde la membrana plasmática a la vacuola otorgaría resistencia a nivel fisiológico a drogas que alteran las vías de tráfico endocíticas en las plantas *bzip25-2*, lo que es concordante con el rol propuesto para bZIP25 como regulador negativo de la endocitosis.

En base a los resultados de la dinámica de internalización de la membrana marcada endocítico en condición control y luego de la inhibición de vías endocíticas mediada por el tratamiento con BFA y Wm determinamos que la deficiencia de bZIP25 provoca una aceleración de la ruta endocítica indicando que bZIP25 es un regulador negativo de la endocitosis desde la membrana plasmática y el tráfico hasta la vacuola. bZIP25 participaría en la regulación de la ruta endocítica en dos niveles, en la endocitosis de membrana plasmática a endosomas y en el tráfico desde el compartimento pre-vacuolar a vacuola. Esto es concluido por la endocitosis acelerada observada en la línea deficiente de bZIP25, *bzip25-2*, y respuesta diferencial a la alteración de las vías endocíticas mediadas por las drogas BFA y Wm tanto a nivel celular como a nivel de planta completa.

Para estudiar el rol de bZIP25 en la regulación transcripcional de genes de tráfico en el desarrollado a continuación se analizó el efecto de la deficiencia de bZIP25 en la expresión de genes de tráfico conectados a bZIP25 en las redes de tráfico (Objetivo 1, Tabla 2) en condición control y en respuesta a la alteración de vías endocíticas mediadas por BFA y Wm. Estos resultados luego fueron correlacionados con la evidencia celular y fisiológica que nos muestra a bZIP25 como un regulador negativo de la endocitosis, particularmente del tráfico desde la membrana plasmática a endosomas y desde MVB/PVC a vacuola para determinar la participación de bZIP25 como un regulador transcripcional del tráfico endocítica.

3.3.3 Efecto de la deficiencia del/os factores de transcripción candidato/s en procesos fisiológicos dependientes del tráfico como el desarrollo de la raíz y resistencia a estrés abiótico.

Para determinar si la regulación del tráfico a través del sistema de endomembrana genera un efecto sobre procesos fisiológicos relacionados con el tráfico de proteínas analizamos la arquitectura radicular y la resistencia a salinidad de plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes de bZIP25. Este análisis permite dar relevancia fisiológica a la regulación de la expresión de genes de tráfico y del tráfico en si mediada por el factor de transcripción bZIP25.

En nuestro laboratorio se ha descrito una correlación positiva entre la aceleración de la endocitosis y el aumento de las raíces laterales a través de la aceleración farmacológica de vías endocíticas mediante el uso de la droga Sortin2 (Pérez-Henríquez et al, 2012). En base a este antecedente analizamos la arquitectura radicular de la línea deficiente de bZIP25, *bzip25-2*. La mutante *bzip25-2* presenta un

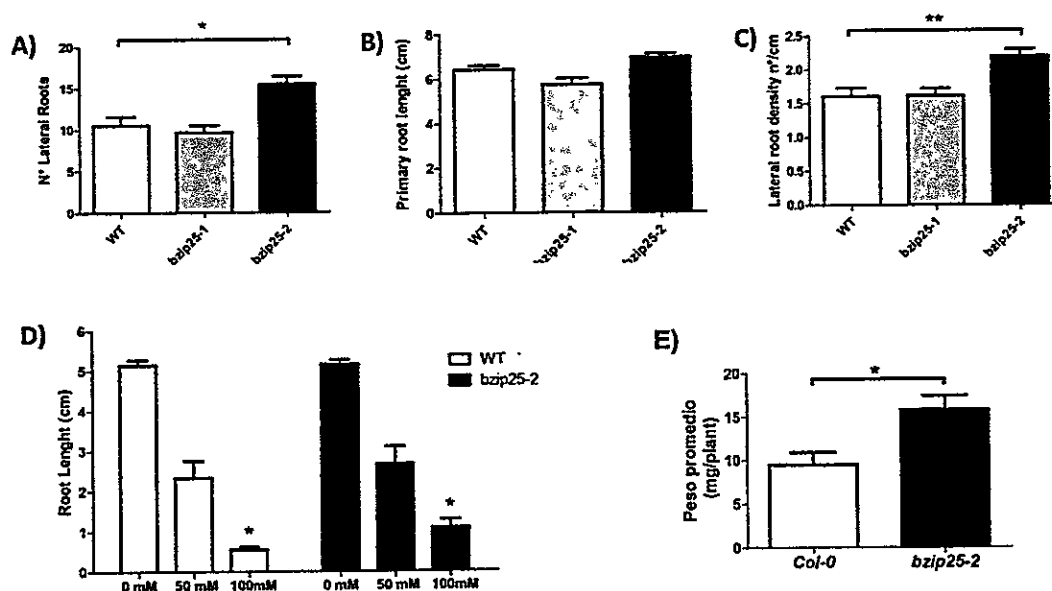


Figura 19: Efectos de la deficiencia de bZIP25 en la fisiología de la planta: arquitectura de la raíz y resistencia a salinidad.

En A-C se muestra el análisis de la arquitectura de la raíz en plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días crecidas en condición control a través de la medición de A) número de raíces laterales, B) largo de la raíz y C) Número de raíces laterales. D) Largo de la raíz principal de plántulas de 7 días crecidas en medio de cultivo de *Arabidopsis thaliana* suplementado con NaCl. Concentración final de NaCl 0, 50 y 100 mM. E) Peso promedio de plantas germinadas y cultivadas en medio de cultivo suplementado con 150 mM de NaCl por 21 días. (*) Cambios estadísticamente significativos respecto a la planta silvestre (t -student $p \leq 0,05$).

mayor largo de la raíz principal y además presenta mayor densidad de raíces laterales que la línea silvestre (Figura 19A-C). Este resultado se correlaciona con la endocitosis y el tráfico a vacuola acelerado que presenta la línea *bzip25-2*, por lo tanto sugiere que la regulación de la ruta endocítica mediada por bZIP25 tendría un efecto en la organogénesis de raíces laterales, y el crecimiento de la raíz principal. Para verificar esta relación se está estudiando el efecto de drogas que alteran la vía endocítica en la densidad de raíces laterales en la línea deficiente de bZIP25 y a nivel celular en cuanto a la endocitosis y el tráfico a vacuola. Estos resultados están siendo correlacionados para verificar que la aceleración de la endocitosis es causante de la modificación de la arquitectura de la raíz en la línea mutante deficiente de bZIP25. Este estudio está siendo realizado en nuestro laboratorio por Claudio Osorio en su Seminario de Título. Una vez comprobada la relación entre la regulación de la endocitosis y la organogénesis de raíces laterales en la línea deficiente de bZIP25, contaremos con evidencia genética sobre la relevancia de la endocitosis en la regulación de la organogénesis de raíces laterales.

Se ha descrito que existe una relación entre la endocitosis y la resistencia al estrés abiótico, particularmente al estrés salino, donde mutantes con pérdida de función de ciertos genes de tráfico tienen alterada la sensibilidad a estrés salino (Mazel et al., 2004; Leshem et al., 2006; Kim et al., 2011). En base a estos antecedentes analizamos el comportamiento de la línea *bzip25-2* a tratamientos salinos donde observamos que plantas deficientes de bZIP25 presentan mayor tolerancia al tratamiento salino que las plantas silvestres (Figura 19D). Este resultado nos indica que la deficiencia de bZIP25 tiene asociado otro fenotipo fisiológico que ha sido previamente relacionado con la capacidad endocítica de las plantas, además de los

cambios de la arquitectura de la raíz, como es la tolerancia a salinidad. Interesantemente, en relación a la tolerancia a salinidad, se ha descrito que la mutante constitutivamente activa de ARA6 presenta mayor tolerancia a salinidad (Ebine et al., 2011). Este fenotipo presentado por la mutante constitutivamente activa de ARA6 se correlaciona con el mayor nivel de transcrito que presenta ARA6 en la mutante deficiente de bZIP25 y la tolerancia a salinidad presentada por esta mutante. Actualmente, estamos analizando la tasa endocítica de la línea mutante constitutivamente activa de ARA6 para verificar la relación entre endocitosis y tolerancia a salinidad en esta línea.

Analizamos otras respuestas fisiológicas relacionadas con el tráfico endocítico y particularmente con la endocitosis, como es la respuesta gravitrópica la cual depende de la endocitosis de transportadores de auxina desde la membrana plasmática a la vacuola. Para esto determinamos el ángulo de respuesta post-estimulo gravitrópico en la línea deficiente de bZIP25 y en la planta silvestre. En este análisis no observamos alteración de la respuesta al estímulo gravitrópico en la línea mutante *bzip25-2*, respondiendo de la misma forma que la planta silvestre. Esto nos indica que los procesos de tráfico relacionados con la respuesta gravitrópica no son alterados por la mayor tasa endocítica que presenta la mutante deficiente de bZIP25.

Los resultados del estudio de procesos fisiológicos mediados por el tráfico a través del sistema de endomembrana y, particularmente la endocitosis y el tráfico a vacuola, nos muestran que la regulación de la endocitosis mediada por bZIP25 tiene efecto sobre procesos fisiológicos como es la tolerancia a salinidad y la arquitectura de la raíz. Esto nos indica la importancia que tiene la regulación del tráfico mediada por bZIP25 en el desarrollo de la planta y en su capacidad para responder a estímulos y/o estrés.

3.4 Objetivo específico 4.

Estudio de la de la participación del/os factor/es de transcripción seleccionado/s en la regulación de expresión de genes de tráfico utilizando genética funcional.

3.4.1 Determinación de los niveles de transcrito de genes de tráfico secretorios y endocíticos conectados a bZIP25 en la línea mutante deficiente de bZIP25.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis hemos privilegiado el estudio del factor de transcripción bZIP25 por sobre los otros factores de transcripción seleccionados, y nos enfocamos en dilucidar la participación de bZIP25 en la regulación de la transcripción de genes de tráfico. Analizamos los niveles de transcrito de los genes de tráfico seleccionados en el Objetivo 2 (Tabla 2) en las líneas mutantes *bzip25-1* y *bzip25-2*, y también en la línea silvestre (Col-0) mediante RT-qPCR. Los genes de tráfico seleccionados han sido clasificados como genes de tráfico secretorios y endocíticos (Tabla 2). Los genes secretorios corresponden a aquellos genes de tráfico relacionados con compartimentos o vías involucradas en la ruta secretoria (Figura 1) como son los genes *EMP24-L1*, *SARA1A* y *BIP3*. Los genes endocíticos corresponden a aquellos que participan en vías de tráfico que conectan la membrana plasmática o proteínas localizadas en ella y a la vacuola, así como los compartimentos intermedios entre estas dos estructuras. Dentro de estos genes encontramos a la t-SNARE *SYP122*, a la GTPasa monomérica *ARA6* y la proteína de cubierta *CLC2*. La mayoría de los genes endocíticos participa tanto en la ruta endocítica como también en la ruta secretoria que destina proteínas a compartimentos como TGN/EE, MVB/PVC y hacia vacuola, sin embargo en esta tesis estos genes serán mencionados como genes endocíticos.

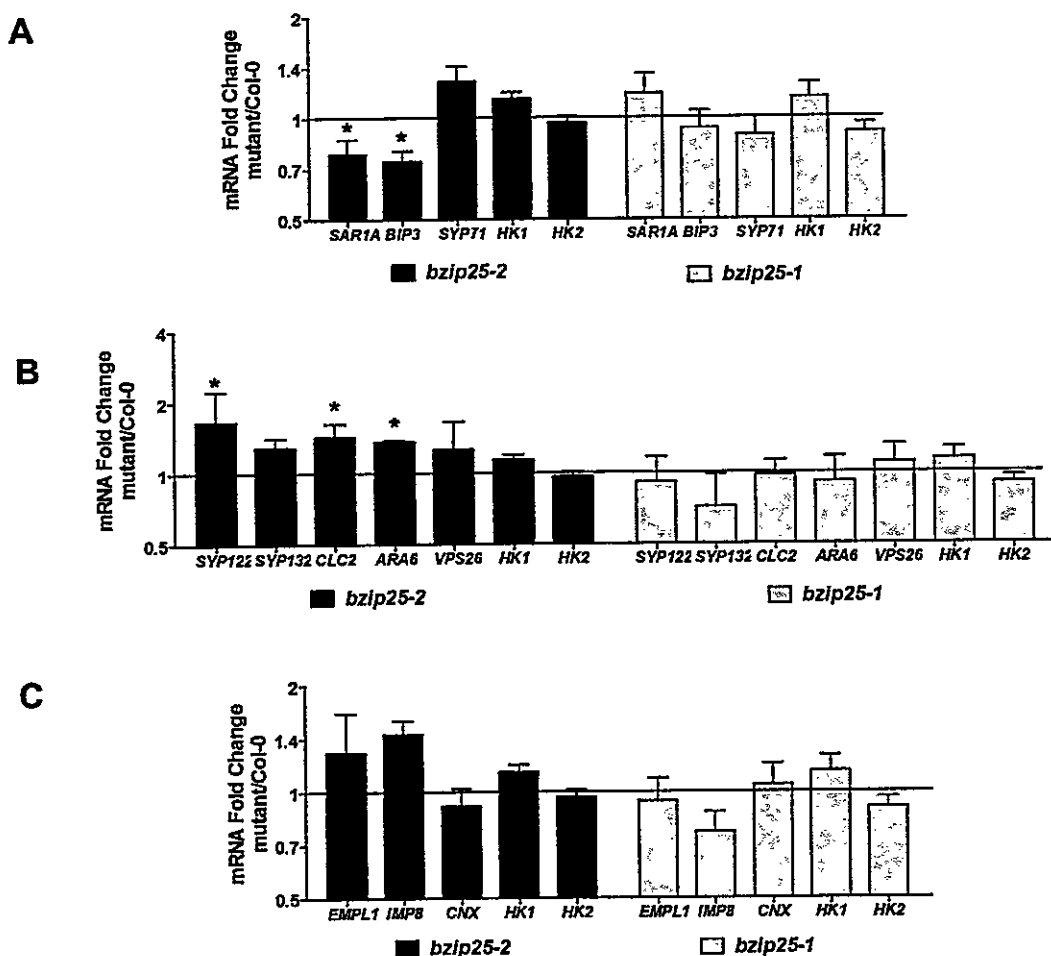


Figura 20: Efecto de la deficiencia de bZIP25 sobre los niveles de transcripto de genes de tráfico.

Los niveles de transcripto de algunos de los genes de tráfico seleccionados en esta tesis fueron cuantificados mediante RT-qPCR en plantas silvestres, *bzip25-1* y *bzip25-2* de 10 días. El nivel de transcripto es expresado como nivel de transcripto relativo a las plantas silvestres. Los genes de tráfico analizados fueron clasificados como genes secretorios (A), genes endocíticos (B) y genes no conectados a bZIP25 en la Red Transcripcional (C). Las barras grises corresponden a los niveles de transcripto de la línea *bzip25-1* y las negras a la mutante *bzip25-2*. Para considerar cambios en el nivel de transcripto de los genes de tráfico se realizó un análisis estadístico de t-Student respecto a los genes housekeeping (hk1 = act2, hk2 = ubq10, t-student $p < 0,05$). Experimento realizado en triplicado biológico.

En este objetivo determinamos los niveles de transcrito de genes de tráfico de plantas de 10 días de las líneas mutantes de *bZIP25*, *bzip25-1* y *bzip25-2* y de la planta silvestre. En este análisis observamos que los niveles de transcrito de genes de tráfico secretorios *SARA1A* y *BIP3* presentan una disminución de sus niveles de transcritos en la mutante deficiente de *bZIP25* respecto a la planta silvestre (Figura 20A). Mientras que los genes de tráfico endocíticos *ARA6* y *CLC2* muestran un aumento de sus niveles de transcritos en la mutante *bzip25-2* (Figura 20B). *SYP122* también presenta un aumento de los niveles de transcrito en la mutante deficiente de *bZIP25*, pese a que este cambio no presenta significancia estadística. Estos resultados sugieren que *bZIP25* participación como un regulador positivo de los genes secretorios y un regulador negativo de los genes endocíticos. Consistentemente, la línea *bzip25-1* no presenta cambios de los niveles de transcrito de los genes de tráfico analizados tanto secretorios como endocíticos (Figura 20), lo que concuerda con que esta línea no presenta cambios significativo de los niveles de transcrito de *bZIP25* (Figura 13). Esto refuerza los resultados obtenidos de la línea mutante *bzip25-2*, indicando que son un efecto de la deficiencia de *bZIP25* y no un efecto producido por la inserción de T-DNA por sí misma. Es importante destacar que todos los genes de tráfico analizados clasificados como secretorios o endocíticos están conectadas en la Red Transcripcional a *bZIP25*, por lo tanto podrían ser blancos directos de este factor de transcripción, aunque estudios posteriores son necesarios para verificar esto. Adicionalmente, analizamos 3 genes de tráfico de la etiqueta GO:0006886 que no están conectados a *bZIP25* y estos no presentaron cambios significativos ninguna de las mutantes analizadas (Figura 20C), mostrando consistencia con la información entregada por las redes de interacción utilizadas en esta tesis.

Los cambios de los niveles de transcrito de estos genes de tráfico podrían tener un efecto en la función del sistema de endomembrana en procesos como el mantenimiento y función de organelos como el retículo endoplasmático y la vacuola o el tráfico vesicular, donde podrían estar implicados genes secretorios y endocíticos, respectivamente. En cuanto al tráfico vesicular observamos que existe una correlación entre el aumento de los niveles de transcrito de genes endocíticos en la línea *bzip25-2*, y la mayor tasa endocítica y tráfico entre MVB/PVC y vacuola observada en el objetivo 3. Por lo tanto, la regulación negativa ejercida por bZIP25 sobre estos genes endocíticos tendría como efecto la regulación negativa de la vía endocítica y el tráfico a vacuola (Figura 14 y 15).

Por otra parte, la regulación de los genes secretorios determinados podrían tener un efecto en la morfología del retículo endoplasmático observada previamente (Figura 13). De esta forma bZIP25 podría estar participando en la regulación del mantenimiento y función del retículo endoplasmático a través de la regulación de genes secretorios. Sin embargo, mayores análisis son necesarios para establecer una relación entre el retículo endoplasmático y/o la secreción y los cambios de los niveles de transcritos en la línea mutante deficiente de bZIP25.

Estos resultados indican que bZIP25 participaría en la regulación la expresión de algunos de los genes de tráfico analizados tales como: *BIP3*, *SARA1A*, *CLC2* y *ARA6*. Por lo tanto podría estar involucrado en la regulación de la respuesta transcripcional de estos genes de tráfico frente a la alteración del funcionamiento de las vías de tráfico. Para responder esta pregunta analizamos los niveles de transcrito de estos genes de tráfico en respuesta a la inhibición de vías de tráfico mediada por las drogas BFA y Wm.

3.4.2 Análisis de la participación de bZIP25 en la respuesta transcripcional a la alteración del funcionamiento de vías de tráfico.

La participación de bZIP25 en la respuesta transcripcional de genes de tráfico en respuesta a la alteración del funcionamiento del tráfico fue analizada a través de la inhibición farmacológica de ciertas vías de tráfico. En esta tesis nos enfocamos en el estudio de vías endocíticas por sobre las vías secretoria en base a que la regulación transcripcional de estas vías no ha sido descrita en plantas, por lo tanto encontrar información acerca de componentes y puntos de regulación de esta ruta es altamente relevante e innovador. Para esto se determinó el efecto de la inhibición de las vías de tráfico sobre los niveles de transcritos de genes de tráfico mediante RT-qPCR utilizando las drogas BFA y Wm usadas previamente en el objetivo 3 (Figura 16 y Figura 17). Los tratamientos fueron realizados en plantas de 10 días de genotipo *bzip25-2* y silvestre (Col-0) por 5 horas para el tratamiento con BFA y 3 horas para el tratamiento con Wm, luego de lo cual se extrajo el RNA de las plantas tratadas. El efecto de la droga fue verificado mediante microscopía confocal a través de la visualización de los efectos celulares descritos para estas drogas, esto es el cuerpo de BFA para el tratamiento con BFA, y la formación de los anillos endosomales para el tratamiento con Wm.

La información obtenida de la cuantificación de los niveles de transcrito es presentada clasificando los genes de tráfico en genes secretorios y endocíticos (Tabla 2). El análisis de niveles de transcrito de los genes secretorios nos muestra que al comparar los cambios de los niveles de expresión entre la línea *bzip25-2* y silvestre en la control (EtOH) se observa un aumento de los niveles de transcrito de *SARA1A*, sin

embargo, *BIP3* no presenta cambios en sus niveles de transcritos (Figura 21A). Estos resultados muestran una discrepancia a los resultados mostrados previamente sobre la cuantificación de los niveles de transcrito en plantas en cuanto a *SARA1A*, ya que en las plantas sin tratamiento se observó una disminución de los niveles de transcrito de *SARA1A* y de *BIP3* en la línea deficiente de *bZIP25* (Figura 20A). En el tratamiento control de BFA tampoco se detectó el aumento de los niveles de transcrito de *SYP122*, *CLC2* y *ARA6* que fue previamente observado en las plantas no tratadas (Figura 20B). De manera similar Esto indica que la condición control de BFA (EtOH) provocaría la alteración de los niveles de transcrito de *SARA1A*, *BIP3* y de los genes endocíticos que enmascararía el rol de *bZIP25* en la regulación de estos genes de tráfico.

Respecto a los niveles de transcrito de *SARA1A*, cuando se realizó la comparación de los niveles de transcrito entre la línea *bzip25-2* y la línea silvestre en el tratamiento con BFA, se observa una disminución de los niveles de transcrito de *SARA1A* y *BIP3* en la línea *bzip25-2* (Figura 21C). La respuesta a BFA es menor en la línea mutante *bzip25-2* que la presentada en la línea silvestre, tanto para *SARA1A* como para *BIP3* como muestra la cuantificación de los niveles de transcrito entre el tratamiento con BFA y la condición control de la línea silvestre y *bzip25-2* (Figura 21E). Interesantemente, los niveles de *CNX* no son alterados en ninguna de las condiciones analizadas ni en los dos genotipos analizados. Estos resultados nos indican que en respuesta a la inhibición de vías de tráfico mediada por BFA se induce la expresión de *SARA1A* y *BIP3*. Esta inducción estaría en parte mediada por *bZIP25* el cual actuaría como un regulador positivo de los genes de tráfico secretorios, por lo que en la mutante deficiente de *bZIP25* los cambios transcripcionales en respuesta a BFA son menores

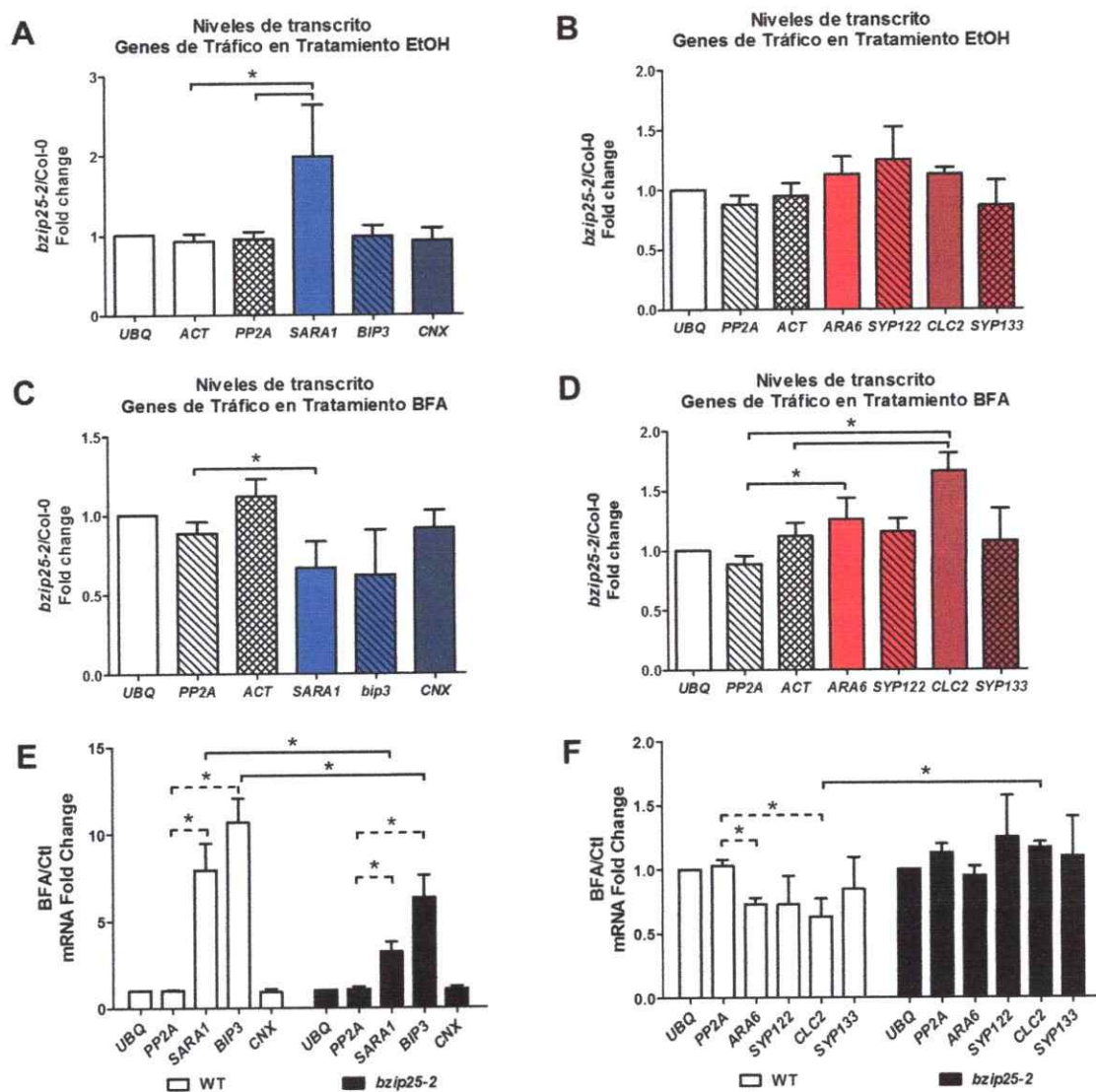


Figura 21: Efecto de BFA sobre los niveles de transcrito de genes de tráfico en la línea deficiente de bZIP25.

Los niveles de transcrito de algunos de los genes de tráfico seleccionados en esta tesis fueron cuantificados mediante RT-qPCR en plantas silvestres y *bzip25-2* de 10 días tratadas con BFA (50 μ M, 5 horas incubación). Los genes de tráfico analizados fueron clasificados como genes secretorios y genes endocíticos. Se determinó el nivel de transcrito de genes de tráfico en la línea *bzip25-2* en la condición control y en el tratamiento con BFA para genes secretorios y endocíticos expresados como nivel de transcrito relativo a las plantas silvestres en la condición control. En **A** y **B** se muestra el nivel de transcrito de genes de

tráfico en la condición control de genes secretorios y endocíticos, respectivamente. En C y D se muestra el nivel de transcrito de genes de tráfico en el tratamiento con BFA de genes secretorios y endocíticos, respectivamente. El efecto de BFA sobre los niveles de transcrito de genes de tráfico en la línea silvestre y *bzip25-2* es expresado como nivel de transcrito relativo a la condición control para cada una de las líneas. En E y F se muestra el nivel de transcrito de genes de tráfico en la condición control de genes secretorios y endocíticos, respectivamente. En barras blancas se muestran los niveles de transcrito de la planta silvestre y en barras negras los niveles de transcrito de las líneas *bzip25-2*. Se realizó una prueba estadística de t-student ($p \leq 0,05$). Experimento realizado en triplicado biológico.

que en la planta silvestre. En este análisis también se determinó que en el tratamiento con BFA la línea deficiente de *bZIP25* presentó mayores niveles de transcrito de *CLC2* y *ARA6* que la línea silvestre, estadísticamente significativos (Figura 21D). Respecto a los cambios de niveles de transcritos que ocurren en respuesta al tratamiento con BFA determinamos que en la línea silvestre hay una disminución de los niveles de transcrito de los genes *CLC2* y *ARA6* (Figura 21F). La mutante *bzip25-2* no presenta esta disminución de los niveles de transcrito de estos genes de tráfico en respuesta a BFA, incluso *CLC2* aumenta sus niveles de transcrito en respuesta a BFA en la línea *bzip25-2* (Figura 21F). Esto nos indica que *bZIP25* participaría en la regulación negativa de estos genes de tráfico y que la deficiencia de *bZIP25* evita la disminución de la expresión de *ARA6* y permite la inducción de la expresión de *CLC2* en respuesta a BFA.

Por lo tanto, estos resultados nos indican que en la planta deficiente de *bZIP25* no se observa la respuesta represora provocada por BFA sobre los genes de tráfico endocíticos analizados, los cuales no modifican sus niveles o incluso aumentan, como es el caso de *CLC2*, sugiriendo la participación de *bZIP25* en la respuesta a la inhibición de vías endocíticas mediada por BFA (Figura 21). Adicionalmente, estos resultados apoyan los resultados obtenidos anteriormente (Figura 20), que indican a *bZIP25* como un regulador negativo de los genes de tráfico endocíticos. Similarmente, el menor aumento de los genes de tráfico secretorios en el tratamiento con BFA indica que *bZIP25* también participa en la respuesta a BFA regulando genes secretorios, actuando como un regulador positivo de ellos, reforzando lo observado anteriormente en este objetivo (Figura 20). Interesantemente, ambos roles sugeridos para *bZIP25* se correlacionan con el aumento de los niveles de transcrito que presenta *bZIP25* en

respuesta a BFA en una planta silvestre, apoyando estas conclusiones (Figura 22). Por otra parte, Los distintos cambios en los niveles de transcritos observados entre la línea *bzip25-2* y la línea silvestre (Figura 20) frente a BFA se correlacionan con la diferencia en la respuesta celular (Figura 16) así como a la distinta sensibilidad a esta droga a nivel de planta completa (Figura 18).

Adicionalmente, se analizó el efecto transcripcional de Wm sobre la expresión de genes de tráfico endocítico en la línea silvestre y la línea deficiente de bZIP25 en base a que esta droga inhibe vías de la ruta endocítica (Figura 1) y a la sensibilidad diferencial a Wm que presenta la mutante *bzip25-2* a nivel celular y fisiológico (Figura 16 y 18). En este análisis se obtuvo que la línea *bzip25-2* presenta mayores niveles de transcrito de *CLC2* que la planta silvestre en el tratamiento a Wm (Figura 23A). En el tratamiento control se determinó que los niveles de transcrito de *CLC2* y *ARA6* son mayores en la mutante *bzip25-2*, respecto a la planta silvestre (Figura 23B) lo es concordante con lo observado previamente (Figura 20B). El aumento de los niveles de transcrito de estos genes de tráfico endocíticos observado en el tratamiento con Wm masi como en su control (DMSO) nos indican que bZIP25 actúa como un regulador negativo de ellos, apoyando los resultados mostrados previamente (Figura 20). En cuanto a la respuesta a la inhibición de la ruta endocítica mediada por Wm observamos que entre los genes endocíticos analizados solo el nivel de transcrito de *CLC2* cambia en respuesta a Wm aumentando respecto a la condición control en la planta silvestre y también en la planta *bzip25-2* (Figura 23C). Si bien el promedio de la inducción de *CLC2* es mayor en la mutante *bzip25-2* no se observa una diferencia significativa en la respuesta transcripcional a Wm de los genes endocíticos analizados entre la planta

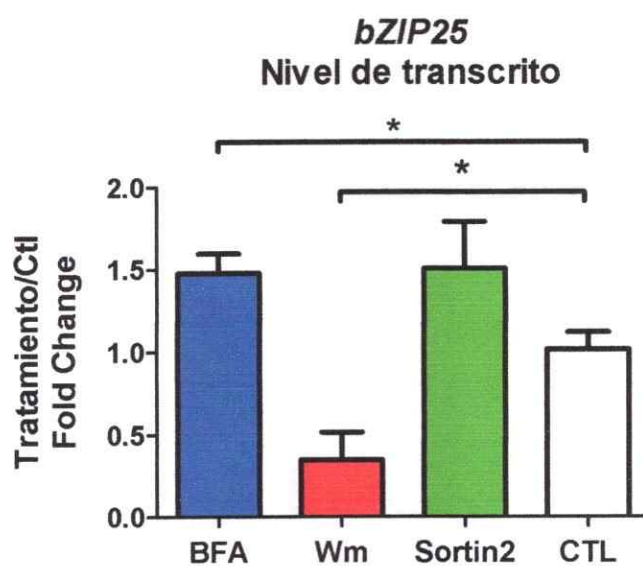


Figura 22: Efecto de la alteración de vías de tráfico endocítico sobre los niveles de transcrito de *bZIP25*.

Cuantificación del nivel de transcrito de *bZIP25* mediante RT-qPCR en plantas silvestres (Col-0) de 10 días tratadas con drogas alteran el tráfico endocítico. Se realizaron tratamientos con BFA (50 μ M, 5 horas de incubación), Wm (33 μ M, 3 horas de incubación) y Sortin2 (50 μ g/mL, 6 horas de incubación) y sus respectivos tratamientos control. Los niveles de transcrito fueron expresado como niveles de transcrito relativo a la condición control. Se realizó una prueba estadística de t-student ($p < 0,05$). Experimentos realizados en triplicado biológico.

silvestre y la planta deficiente de bZIP25. Esto puede explicarse por los mayores niveles de transcrito de *CLC2* que existe tanto en la condición control como en respuesta a Wm (Figura 23A y 23B).

Este análisis nos indica que bZIP25 participaría en el mantenimiento de la expresión de genes de tráfico endocíticos actuando como un represor, pues la deficiencia de bZIP25 permitiría la inducción de la expresión de genes de tráfico, apoyando la evidencia que indica a bZIP25 como un regulador negativo de genes de tráfico endocítico. Esto se correlaciona directamente con el cambio en el nivel de transcrito de bZIP25 en respuesta a Wm observado en plantas silvestre, donde el transcrito de bZIP25 disminuye más del 50% en respuesta a BFA (Figura 22). Respecto a la correlación existente entre los niveles de transcrito de genes de tráfico, observamos que los niveles de transcrito aumentados de *CLC2* y *ARA6A* podría explicar la sensibilidad diferencial que presente la mutante *bzip25-2* a nivel celular y fisiológico a la inhibición de la vía endocítica mediada por Wm.

En conjunto los análisis de los niveles de transcrito en la mutante *bzip25-2* y de su respuesta a las drogas BFA y Wm permite reforzar la evidencia mostrada anteriormente que indica que bZIP25 es un regulador del sistema de endomembrana, particularmente de la endocitosis y del tráfico a vacuola. Esto ocurriría a través de la regulación transcripcional de genes de tráfico, donde actuaría como un regulador negativo sobre los genes de tráfico endocíticos y un regulador positivo de genes de tráfico secretorios. Esta regulación daría cuenta de la menor respuesta y/o sensibilidad a drogas que alteran vías de tráfico como BFA y Wm tanto a nivel celular como fisiológico.

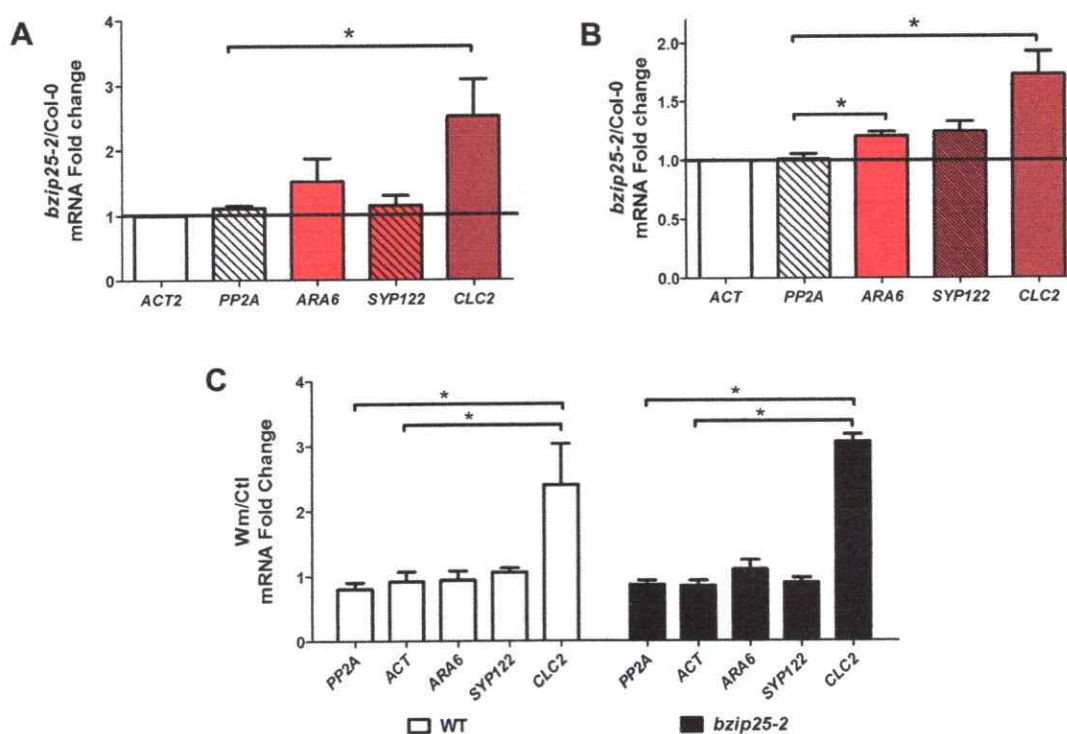


Figura 23: Efecto de Wm sobre los niveles de transcrito de genes endocíticos en la línea deficiente de bZIP25.

Los niveles de transcrito de algunos de los genes de endocíticos seleccionados en esta tesis fueron cuantificados mediante RT-qPCR en plantas silvestres y *bzip25-2* de 10 días tratadas con Wm (33 μ M, 3 horas incubación). Se determinó el nivel de transcrito de genes endocíticos en la línea *bzip25-2* en la condición control (A) y en el tratamiento con Wm (B) expresados como nivel de transcrito relativo a las plantas silvestres en la condición control. El efecto de Wm sobre los niveles de transcrito de genes de tráfico en la línea silvestre y *bzip25-2* es expresado como nivel de transcrito relativo a la condición control para cada una de las líneas (C). En barras blancas se muestran los niveles de transcrito de la planta silvestre y en barras negras los niveles de transcrito de la línea *bzip25-2*. Se realizó una prueba estadística de de t-student ($p \leq 0,05$). Experimento realizado en triplicado biológico.

En resumen los análisis de transcrito realizados en este objetivo sugieren a bZIP25 como un regulador de genes de tráfico siendo un regulador positivo de genes secretorios y negativo de genes endocíticos. En esta tesis es particularmente interesante la regulación negativa que tendría bZIP25 sobre los genes endocíticos ya que esto se correlaciona con la endocitosis acelerada que presenta la línea deficiente de bZIP25, así como la sensibilidad diferencial que presenta esta línea a drogas que alteran el funcionamiento de vías endocíticas como BFA y Wm.

Para complementar el análisis genético funcional realizado con las mutantes insercionales de bZIP25 se generaron líneas que expresan al factor de transcripción bZIP25 bajo el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico del coliflor y de esta forma provocar la sobre-expresión o complementación de bZIP25 en plantas silvestres y la línea deficiente de bZIP25, *bzip25-2*, respectivamente. Estas líneas han sido utilizadas para la corroboración de la función de este factor de transcripción en la regulación del tráfico endocítico. Para esto hemos identificado y clonado los marcos de lectura que codifican para bZIP25 en la base de datos de *Arabidopsis thaliana* TAIR (www.arabidopsis.org). En esta base de datos se encuentran anotados 3 modelos génicos para el locus AT3G54620 que codifican para tres isoformas de bZIP25 (Figura 24). De los cuales solo se ha identificado el mRNA de la versión AT3G54620.1, correspondiente de 1469 nucleótidos con un marco de lectura abierto de 1212 nucleótidos que codifican para 403 aminoácidos. Este marco de lectura genera una proteína que posee dos dominios de cierre básico de leucina en la porción media y carboxilo terminal de la proteína (Figura 24). La versión AT3G54620.3 difiere de la versión AT3G54620.1 por 66 nucleótidos (33 aminoácidos), que se traduce en un

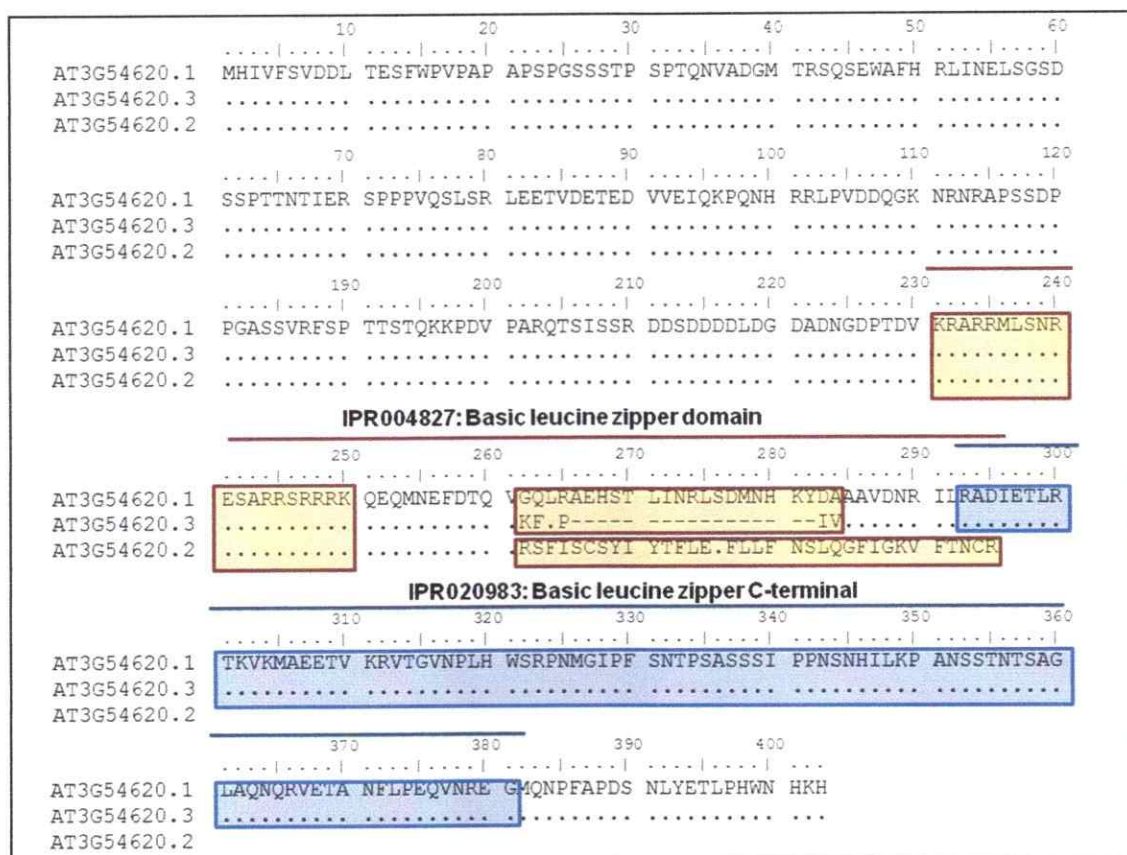


Figura 24: Alineamiento y predicción de dominios de las isoformas de bZIP25.

bZIP25 presenta tres modelos génicos en la base de datos TAIR los que dan origen a 3 isoformas proteicas. El alineamiento de secuencias de estas tres isoformas realizado por alineamiento múltiple ClustalW utilizando el programa Bioedit y la predicción de motivos se realizó utilizando la herramienta InterproScan de EMBL-EBI muestra que las tres isoformas son idénticas hasta el aminoácido 261. Se destaca que la isoforma AT3G54620.2 pierde el motivo de cierre de leucina C-terminal IPR020983 (azul) pero mantiene el dominio de cierre básico de leucina IPR004827 (Rojo).

dominio de cierre básico de leucina de menor tamaño para la versión AT3G54620.3 (Figura 24). Por otra parte, la versión AT3G54620.2 presenta un arreglo de exones distinto, donde el cuarto intrón no se elimina como producto de un splicing alternativo generando un codón de término anticipado que se traduce en una proteína de 295 aminoácidos que no presenta el segundo dominio de cierre básico de leucina (Figura 24).

Para el clonamiento de las isoformas de bZIP25 se diseñaron un conjunto de partidores que nos permiten amplificar por PCR las tres versiones de bZIP25 para luego clonarlo en el vector pCR8/GW/TOPO/TA. La amplificación se realizó a partir de cDNA de plántulas de genotipo silvestre (Col-0) de 10 días, y logramos clonar con éxito las versiones AT3G54620.1 y AT3G54620.2. Sin embargo, no se obtuvo el amplificado de la versión AT3G54620.3 en las condiciones utilizadas. La verificación del clonamiento se realizó mediante PCR, digestión con enzimas de restricción (Anexo 3) y secuenciación. Para el caso de AT3G54620.1 la secuenciación del clon utilizado en esta tesis presentan dos mutaciones silentes. En el caso de AT3G54620.2 se obtuvo un clon con una mutación en el cuarto codón que genera un cambio de una isoleucina a una valina. Esta mutación fue considerada como inocua, ya que es un cambio por un aminoácido de características similares en una porción de la secuencia que no es parte de los motivos característicos de este factor de transcripción. Ambas secuencias, AT3G54620.1 y AT3G54620.2, están clonadas en el vector pCR8/GW/TOPO/TA, vector que permite el sub-clonamiento en vectores de destino mediante recombinación utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen). El clonamiento de estas dos isoformas en el vector pCR8/GW/TOPO/TA fue realizado en la Unidad de Investigación de Arantzazú Bidegain, estudiante de Ing. en Biotecnología Molecular (Universidad de Chile) que co-

dirigí junto a la Dra. Norambuena. Utilizando el sistema Gateway clonamos las versiones AT3G54620.1 y AT3G54620.2 de bZIP25 en los vectores binarios de destino pGWB5 y pGWB17, que permiten generar una proteína de fusión a GFP y MYC en el carboxilo terminal, respectivamente (Nakagawa et al, 2007). El correcto clonamiento de ambas versiones de bZIP25 en los vectores de destino fue verificado mediante PCR y análisis de restricción (Anexo 4).

Las líneas sobre-expresoras generadas de la transformación con ambas isoformas de bZIP25 están siendo utilizadas para analizar la ganancia de función de bZIP25 en ensayos de dinámica de endocitosis en el Seminario de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular de Claudio Osorio, del cual participo en calidad de Co-Tutora. Estos análisis han permitido mostrar la localización nuclear de bZIP25 y corroborar la función de bZIP25 como un regulador negativo de la endocitosis (Figura 25). La endocitosis fue estudiada a través de la internalización de la membrana plasmática previamente teñida con el trazador FM4-64. En este análisis observamos que la línea *bzip25-2* transformada con el constructo 35S::bZIP25.1-GFP presenta la reversión de la aceleración de la endocitosis, mostrando tasa endocítica menor o igual a la línea silvestre, verificando el rol de bZIP25 en la regulación negativa de la endocitosis.

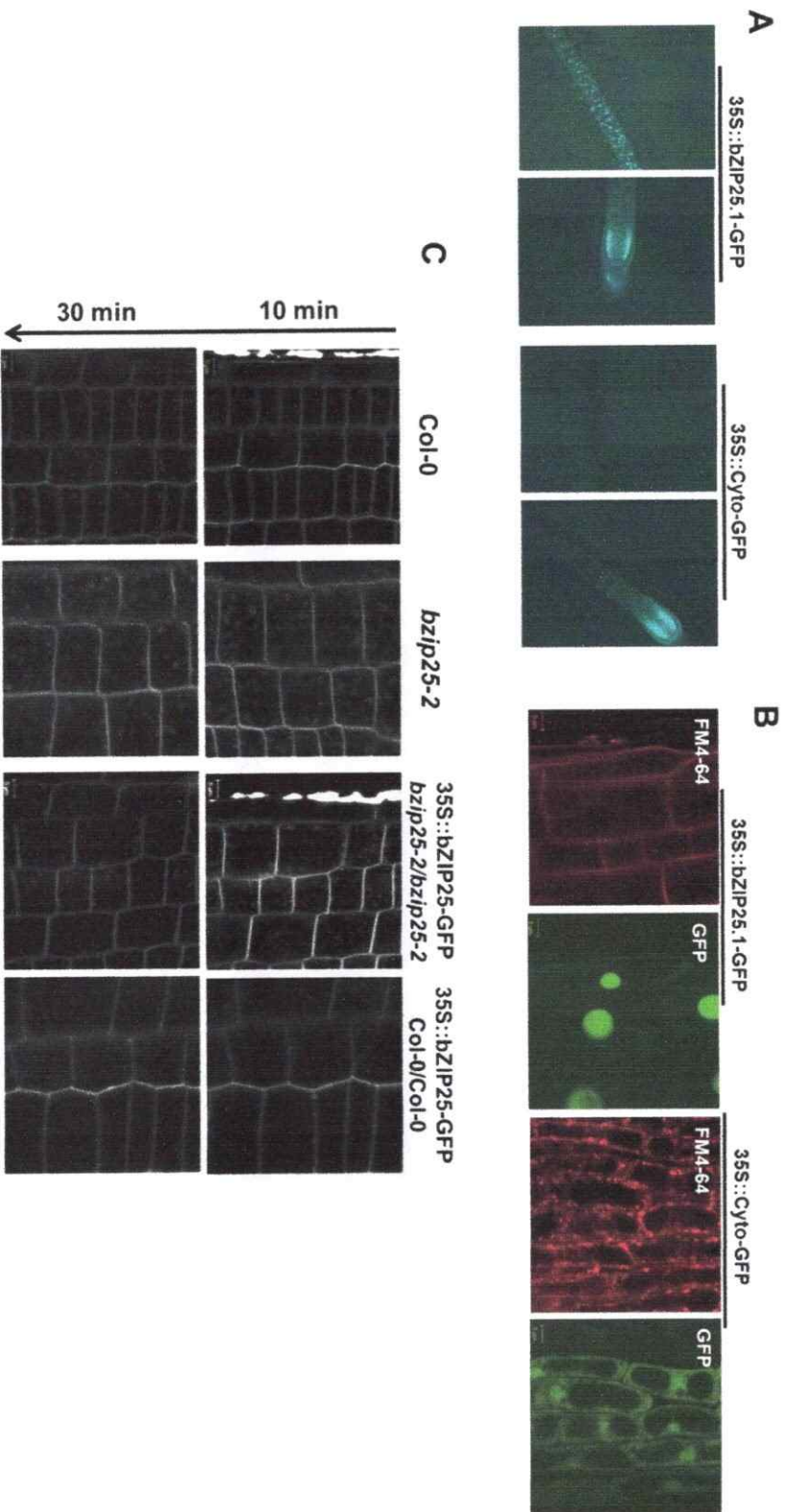


Figura 25. Efecto de la sobre-expresión de la isoforma AT3G54620.1 de bZIP25 en el tráfico endocítico de la membrana plasmática.

Determinación de la localización de la proteína fluorescente GFP fusionada a la isoforma AT3G54620.1 de bZIP25 (bZIP25-GFP) en plántulas de 7 días (35S::bZIP25-GFP *bzip25-2/bzip25-2*) y como control de localización citoplasmática utilizamos una plántula silvestre que expresa una proteína citoplasmática fusionada a GFP (35S::S6PDH-GFP Col-0) observado en

lupa estereoscópica fluorescente (A) y microscopia confocal (B). Se analizó la internalización del trazador de membrana plasmática FM4-64 en células de la punta de la raíz de plantas silvestres (Col-0), *bzip25-2*, *35S::bZIP25-GFP bzip25-2/bzip25-2* y *35S::bZIP25-GFP Col-0/Col-0* de 7 días de *Arabidopsis thaliana*, mediante microscopia confocal (C). Se muestran imágenes representativas de experimentos realizado en triplicado. Barra = 10 μm . Estos ensayos y su análisis fueron realizados por Claudio Osorio en su Seminario de Título, del cual participo en calidad de Co-tutora.

3.4.3 Análisis transcriptómico del efecto de la deficiencia de los factores de transcripción candidato/s sobre la expresión del genoma de *Arabidopsis thaliana* mediante secuenciación masiva de RNA.

Con el objetivo de determinar que otros genes de *Arabidopsis thaliana* estarían siendo regulados por bZIP25 en respuesta a la alteración de las vías de tráfico mediada por el fármaco BFA, determinamos los cambios de expresión del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* provocado por el efecto de la pérdida de función de bZIP25 a través de un análisis de expresión global. Esto nos permite encontrar nuevos genes de tráfico que estarían siendo regulados por bZIP25 así como otros genes que estarían relacionados con otros procesos biológicos. El análisis de expresión global fue realizado utilizando la línea *bzip25-2* y plantas silvestres (Col-0) en condición control y al alterar vías de tráfico farmacológicamente utilizando BFA. Como ha sido mencionado anteriormente, BFA es una droga que inhibe vías relacionadas con procesos endocíticos y secretorios (Figura 1), lo que nos entrega información acerca de la participación de bZIP25 en la regulación de ambas rutas. El análisis de expresión global se realizó mediante secuenciación masiva de RNA (RNAseq) utilizando plantas de 10 días de la línea mutante *bzip25-2* y de la línea silvestre (Col-0) tratadas durante 5 horas con BFA (50 μ M BFA) y en condiciones control (volumen equivalente del solvente, EtOH). Este estudio de expresión global fue realizado en la University of California, Riverside (USA) en el Center of Plant Cell Biology, a través de una colaboración con el Dr. Glenn Hicks. Con la información generada de la secuencia masiva de RNA determinamos los cambios de expresión génica provocados por la deficiencia de bZIP25 respecto a la planta silvestre en la condición control así como en el tratamiento a BFA. Además, se determinó la respuesta a la inhibición mediada por

BFA respecto al tratamiento control para cada uno de los dos genotipos, *bzip25-2* y silvestre.

El análisis de expresión diferencial entre la línea *bzip25-2* y la línea silvestre obtenido de los datos de RNAseq, nos muestra que en la condición control hay un total de 182 genes diferencialmente expresados (Differentially expressed genes, DEG) (Figura 26A, Tabla 2). Esto indica que por efecto de la deficiencia de bZIP25 se altera la expresión de 182 genes en comparación con la planta silvestre: 97 de ellos (53.3%) aumentan sus niveles de transcrito en la mutante deficiente de bZIP25 (DEG+), mientras que 85 (46.7%) disminuyen sus niveles de transcrito en esta mutante (DEG-) (Figura 26A, Tabla 2). Estos datos pueden ser interpretados como que bZIP25 participa en la regulación de estos 182 DEGs de manera directa o indirecta, a través de factores de transcripción que son regulados por bZIP25. En este contexto bZIP25 actuaría como regulador negativo de los DEG+ y un regulador positivo de los DEG-. Sin embargo, los cambios en la expresión de los niveles de transcritos de estos genes puede ser efecto de mecanismos compensatorios frente a la deficiencia de bZIP25 que estaría siendo ejercida por otros factores de transcripción no relacionados necesariamente a la función regulatoria de bZIP25.

En nuestro laboratorio se ha realizado una compilación de información respecto a genes del genoma de *Arabidopsis thaliana* que nos permitió generar una lista ampliada de genes de tráfico que consiste en 520 genes de tráfico (Urbina y Norambuena, resultados no publicados). Este conjunto de genes de tráfico corresponde a más del triple de genes comparado con los 133 genes presentes en la etiqueta GO:0006886 Intracellular protein transport de Gene Ontology

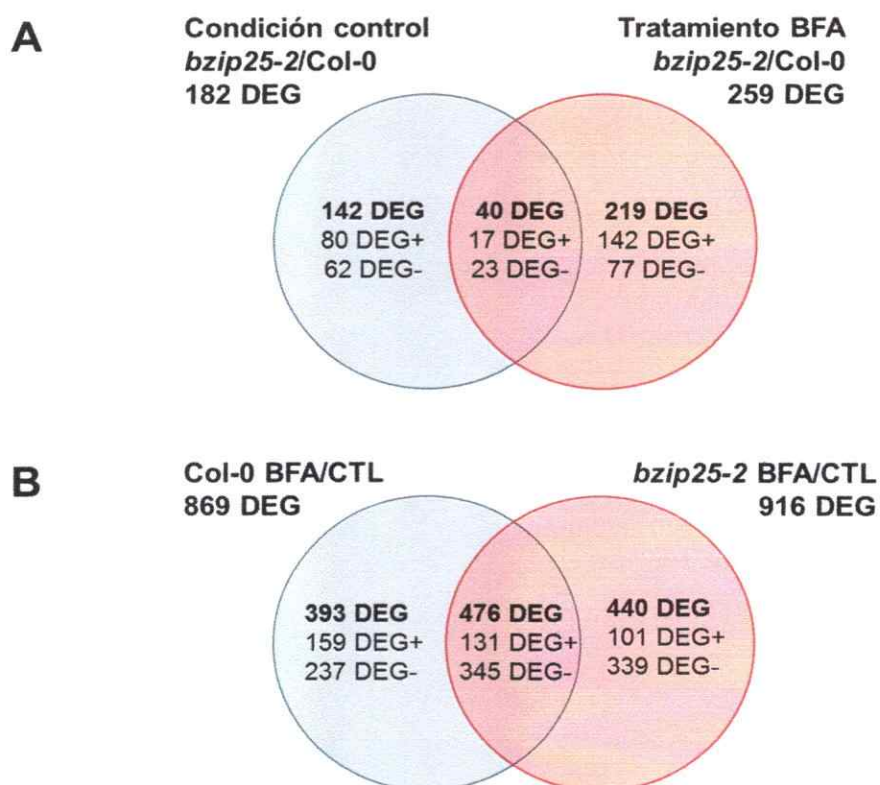


Figura 26. Diagrama de Venn que muestra el sobrelapamiento de los genes diferencialmente expresados en las condiciones estudiadas en el análisis transcriptómico global.

Se presenta esquematizado en diagramas de Venn el número de genes diferencialmente expresados (DEG) en las distintas condiciones analizadas en el análisis transcriptómico global. Las condiciones analizadas comprenden plantas silvestres (*Col-0*) y plantas *bZIP25-2* tratadas con BFA 50 μ M por 5 horas y tratadas en condición control. Se define DEG+ a aquellos DEG que aumentan el nivel de transcrito en la condición analizada, y DEG- a aquellos DEG que disminuyen el nivel de transcrito en la condición analizada. En A son mostrados el total de los DEG obtenidos del análisis transcriptómico entre la línea *bzip25-2* y la línea silvestre tanto en la condición control como en el tratamiento con BFA y el número de DEG que coinciden en ambos análisis. En B son mostrados el total de los DEG obtenidos del análisis transcriptómico al analizar el tratamiento con BFA comparado con la condición control en la línea *bzip25-2* y en la línea silvestre, así como el número de DEG que coinciden en ambos análisis.

Tabla 3: Información de los DEG entre *bzip25-2* y silvestres obtenidos mediante el análisis transcriptómico.

En esta tabla se presenta el número de genes diferencialmente expresados (DEG) entre la línea *bzip25-2* respecto a la línea silvestre en la condición control y en el tratamiento con BFA obtenidos del análisis de secuenciación masiva de RNA. El conjunto de DEG es clasificado como genes diferencialmente expresados que presentan mayor nivel de transcrito en la línea *bzip25-2* que en la wt (DEG+) y genes diferencialmente expresados que presentan menor nivel de transcrito en la línea *bzip25-2* respecto a la silvestre (DEG-). Se indica el número de DEG que presenta conexiones a bZIP25 en la Red Transcripcional, la Red de Co-expresión y la Red Regulatoria. Además se muestra el número de DEG que son parte de nuestra lista curada de 520 genes del sistema de endomembrana.

DEG <i>bzip25-2</i> vs Col-0	DEG +		DEG -		DEG Total	
	Control	BFA	Control	BFA	Control	BFA
#	97 53.3%	159 61.4%	85 46.7%	100 38.6%	182	259
DEG Conectados a bZIP25 en Red Transcripcional	11	41	13	20	24 13.2%	61 23.6%
DEG Conectados a bZIP25 en Red Co-expresión	2	12	1	0	3 1.6%	12 4.6%
DEG Conectados a bZIP25 en Red Regulatoria	0	6	1	0	1 0,6%	6 2.3%
DEG entre los genes de tráfico	2	0	0	0	2 1.1%	0
DEG entre los genes de tráfico conectados a bZIP25 en Red Regulatoria	0	0	0	0	0	0



(<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>), la cual fue utilizada como input para construir la Red Regulatoria de Tráfico (Objetivo 1). La lista curada fue utilizada como input para reconstruir la Red Regulatoria de Tráfico. La lista curada de los genes de tráfico así como la nueva versión de la red fue comparada con los datos obtenidos del RNAseq donde se obtuvo que 2 genes de tráfico son diferencialmente expresados presentando mayores niveles de transcrito en la línea mutante *bzip25-2* que en la línea silvestre. Este análisis de RNAseq nos permitió identificar estos dos nuevos genes de tráfico que podrían estar siendo regulados por bZIP25. Estos genes de tráfico codifican a una proteína del tipo Rho GDP-dissociation inhibitor activity protein y una proteína de la familia ENTH/VHS/GAT (Tabla 3). La función de estas proteínas no ha sido descrita por ensayo directo, sin embargo, de acuerdo a su anotación estos genes están asociados a la regulación de la actividad de GTPasas monoméricas involucradas en tráfico celular y a la interacción con clatrina y/o fosfatidilinositol durante la formación de vesículas, respectivamente. Estos genes podrían estar contribuyendo a la aceleración de la dinámica endocítica que estaría siendo regulada por bZIP25, a pesar que es difícil determinar en qué vías de tráfico participarían estas proteínas dado la función de ellas no ha sido caracterizada.

Utilizando los criterios de construcción de la Red Regulatoria del Tráfico se generó una Red Regulatoria Global en la cual bZIP25 establece conexiones con 265 genes del genoma de *Arabidopsis thaliana*. De estos genes conectados a bZIP25 uno de ellos presenta una disminución de los niveles de transcrito entre la mutante *bzip25-2* y la planta silvestre en la condición control, correspondiente al 0,6% de los genes conectados a bZIP25 en la Red Regulatoria Global (Tabla 3). Este gen corresponde al locus AT1G23440, codifica a una peptidasa C15 y es considerado un buen candidato a

ser regulado de manera positiva por bZIP25 (Tabla 4). Integrando la información obtenida del RNAseq y la contenida en las redes de conectividad global encontramos que 24 DEG (13.2% DEG) entre la línea mutante de *bzip25-2* y la línea silvestre en la condición control están conectados a la Red Transcripcional y 3 DEG (1.6% DEG) están conectados a la Red de Co-expresión (Tabla 3).

En análisis de expresión diferencial entre *bzip25-2* y la planta silvestre en el tratamiento con BFA encontramos 259 DEG entre la planta deficiente de bZIP25 respecto a la línea silvestre en el tratamiento con BFA, de estos 159 DEG (61.4%) son DEG+ y 100 (38.6%) son DEG- (Tabla 3, Figura 26A). Esto nos muestra que en presencia de BFA se generan mayores diferencias de expresión entre la línea *bzip25-2* y la planta silvestre, sugiriendo la participación de bZIP25 en la regulación de la respuesta a BFA. Por lo tanto, la mutante presenta una sensibilidad distinta a la droga a nivel transcripcional, lo que sugiere que bZIP25 participaría de alguna forma en la respuesta transcripcional a la droga inhibitoria de vías de tráfico BFA. Esta respuesta transcripcional diferencial a BFA que se produce en la mutante *bzip25-2* se correlaciona con la sensibilidad diferencial a BFA que presenta la mutante *bzip25-2* a nivel celular y fisiológico (Figura 16 y 18).

Al analizar las conexiones que presentan los DEG entre *bzip25-2* y la planta silvestre en el tratamiento con BFA con las redes de interacción (Objetivo 1), encontramos que 61 DEG están conectados a la Red Transcripcional Global (23.6%), 12 DEG (4.6%) a la Red de Co-expresión Global y 6 DEG (2.3%) a la Red Regulatoria Global (Tabla 2). Estos porcentajes son mayores a los observados en los DEG entre la planta *bzip25-2* y la planta silvestre en condición control. Este aumento se concentra en los DEG+ los que corresponden a un 61.4% de los DEG (Tabla 2), sugiriendo que

Tabla 4: Información de algunos DEG destacados observados en las condiciones estudiadas en el análisis transcriptómico.

Se indica el locus del gen diferencialmente expresado (DEG), una breve descripción del gen y la condición en la que el gen es diferencialmente expresado. Se utilizarán las siguientes abreviaciones para identificar las condiciones analizadas: *bZ/WT CTL* cuando corresponde a un DEG entre la línea mutante *bzip25-2* y la línea silvestre en la condición control, *bZ/WT BFA* cuando corresponde a un DEG entre la línea mutante *bzip25-2* y la línea silvestre en el tratamiento con BFA, *BFA/CTL bZ* cuando corresponde a un DEG entre el tratamiento con BFA y la condición control que solo cambian en la planta *bzip25-2*; *BFA/CTL WT* cuando es un DEG entre el tratamiento con BFA y la condición control que solo cambian en la planta silvestres y *BFA/CTL* cuando el DEG observado entre el tratamiento con BFA y la condición control cambia tanto en la planta silvestre y como en la mutante *bzip25-2*. Además se indica con un signo + cuando el DEG está conectado a la Red Transcripcional (RT), a la Red de Co-expresión (RC), a la Red Regulatoria Global (RRG) o si es un gen de tráfico (GT).

Locus	Descripción	DEG	RT	RC	RRG	GT
AT1G23440	pyroglutamyl peptidase I-like	bZ/WT ctrl	+	+	+	
AT1G12070	Rho GDP-dissociation inhibitor activity protein	bZ/WT ctrl				+
AT1G25240	ENTH/VHS/GAT family protein	bZ/WT ctrl				+
AT1G19180	jasmonate-zim-domain protein 1	bZ/WT BFA	+	+	+	
AT1G43160	related to AP2 6	bZ/WT BFA	+	+	+	
AT2G32030	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	bZ/WT BFA	+	+	+	
AT4G17490	ethylene responsive element binding factor 6	bZ/WT BFA	+	+	+	
AT5G27420	carbon/nitrogen insensitive 1	bZ/WT BFA	+	+	+	
AT5G47230	ethylene responsive element binding factor 5	bZ/WT BFA	+	+	+	
AT1G01700	RHO guanyl-nucleotide exchange factor 2	BFA/CTL bZ				+
AT1G02430	ADP-ribosylation factor D1B	BFA/CTL bZ				+
AT2G44690	Arabidopsis RAC-like 9	BFA/CTL bZ				+
AT4G28950	RHO-related protein from plants 9	BFA/CTL bZ	+			+
AT5G58430	exocyst subunit exo70 family protein B1	BFA/CTL bZ				+
AT5G13990	exocyst subunit exo70 family protein C2	BFA/CTL bZ				+
AT1G33340	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein	BFA/CTL bZ				+
AT3G55150	exocyst subunit exo70 family protein H1	BFA/CTL bZ				+
AT2G22290	RAB GTPase homolog H1D	BFA/CTL bZ				+
AT1G25240	ENTH/VHS/GAT family protein	BFA/CTL bZ				+
AT4G02650	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein	BFA/CTL bZ				+
AT1G09180	secretion-associated RAS super family 1	BFA/CTL	+			+
AT1G18830	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	BFA/CTL				+
AT5G05940	ROP guanine nucleotide exchange factor 5	BFA/CTL				+
AT4G12120	Sec1/munc18-like (SM) proteins superfamily	BFA/CTL	+			+
AT5G59730	exocyst subunit exo70 family protein H7	BFA/CTL	+			+

bZIP25 tendría un papel más relevante en la regulación negativa de la transcripción. De estos 6 DEG+ están conectados a la Red Regulatoria Global por lo que los consideraremos como buenos genes candidatos a ser regulados negativamente por bZIP25. Estos genes corresponden a los siguientes locus: AT1G19180, AT1G43160, AT2G32030, AT4G17490, AT5G27420 y AT5G47230 (Breve descripción funcional en Tabla 4). En respuesta a BFA no se encontró ningún DEG- entre *bzip25-2* y la línea silvestre que esté presente en la Red Regulatoria Global. Por lo tanto dentro de este grupo de genes no encontramos genes candidatos a ser regulados positivamente por bZIP25, sugiriéndonos la relevancia de bZIP25 como un regulador transcripcional negativo.

Interesantemente, en respuesta a la alteración del tráfico mediada por BFA se observaron mayores diferencias en la respuesta transcripcional, donde 6 de los DEGs (2,3% de los DEGs) están conectado en la Red Regulatoria Global, mientras que en la condición control solo 1 de los DEG está conectado a esta red (0,6% de los DEGs). Esto nos sugiere que bZIP25 estaría participando en la respuesta a BFA probablemente como un regulador negativo, de tal forma que al no estar presente se gatillaría una respuesta transcripcional mayor a la alteración de las vías de tráfico. Sin embargo, no observamos expresión diferencial de genes de tráfico en respuesta a BFA entre la planta silvestre y la línea deficiente de bZIP25. En los análisis de RT-qPCR observamos que la línea deficiente de bZIP25, *bzip25-2*, presenta mayores niveles de transcrito de *CLC2* y *ARA6* en el tratamiento con BFA (Figura 21D). Sin embargo, el nivel de transcrito de este en la mutante *bzip25-2* y la línea silvestre no presentó diferencias significativas en el análisis de RNAseq a pesar de que el valor

promedio de lecturas fue mayor en la línea *bzip25-2* (Tabla 5). Esto nos indica que si bien la sensibilidad del RNAseq no permitió reproducir los resultados obtenidos mediante RT-qPCR, si se mantuvo la tendencia sosteniendo los resultados previamente obtenidos.

La información obtenida del RNAseq también nos permitió analizar los cambios transcripcionales en la línea mutante de *bzip25-2* y la línea silvestre (Col-0) presentaron en respuesta al tratamiento con BFA y de esta forma observar similitudes y diferencias en la respuesta a BFA en la línea deficiente de *bZIP25* y en la línea silvestre. La planta silvestre en respuesta a BFA presenta 869 DEG (287 DEG+ y 582 DEG-, Figura 26B), mientras que la línea *bzip25-2* presenta 916 DEG en respuesta a BFA (232 DEG+ y 684 DEG-, Figura 65B). Analizamos las coincidencias y diferencias en los DEG de la planta silvestre y *bzip25-2* en respuesta a BFA. En este análisis encontramos 3 grupos de genes: DEG en respuesta a BFA presentes solo en la planta silvestre (393 DEGs, Tabla 6); DEG en respuesta a BFA presentes únicamente en la planta *bzip25-2* (440 DEG, Tabla 6); y DEG en respuesta a BFA presentes tanto en la planta silvestre como en la planta *bzip25-2* (476 DEG, Tabla 6). Estos últimos DEGs cambian sus niveles de transcrito en respuesta a BFA a pesar de la deficiencia de *bZIP25*, lo que indica que *bZIP25* no estaría participando en la regulación de estos genes y que los cambios de los niveles de transcrito estos DEGs estarían siendo regulados por otros factores de transcripción. Por otra parte, la expresión de los otros dos grupos de DEGs estaría siendo regulada, o por lo menos afectada, por la función de *bZIP25*. Donde los DEG que solo cambian sus niveles de transcrito en la plantas silvestres y no en la planta deficiente de *bZIP25* indica que requerirían de la función de *bZIP25* para responder en el tratamiento con BFA sugiriendo que este factor de

Tabla 5: Nivel de mRNA obtenido en el análisis transcriptómico entre la línea *bzip25-2* y la planta silvestre en la condición control de los genes de tráfico conectados a bZIP25 en la Red Regulatoria del Tráfico.

Se presenta una lista de los genes de tráfico conectados a bZIP25 en la Red Regulatoria del Tráfico indicando su locus y nombre. Además se muestra el valor correspondiente a la lectura normalizada promedio (RPKM) obtenida del análisis transcriptómico global realizado mediante RNAseq.

Locus	Gen	Nivel mRNA	
		WT	<i>bzip25-2</i>
AT3G02460	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein	9,41077133	9,93427926
AT3G14090	EXO70D3	4,22400184	5,62036687
AT3G22950	ARFC1	28,7785715	28,7315349
AT3G51890	CLC3	8,16062762	10,2608337
AT3G54840	ARA6	34,2476198	36,024066
AT5G54310	AGD5	27,1440946	29,5386432
AT5G43900	MYOSIN XII	8,20311392	9,16585102
AT5G61530	Rho-GAP family protein	25,0376093	24,2559886
AT5G47200	RabD2b	87,973567	88,5422131
AT5G52210	ARF-like GTPase family	14,2212358	11,2802009
AT5G63880	VPS20, ESCRTII protein complex	13,6052379	11,6592673
AT3G09740	SYP71	55,8781545	51,556465
AT3G52400	SYP122	35,9576966	43,1806764

transcripción estaría participando en la respuesta de estos genes a BFA, mientras que los DEG que solo cambian en la mutante *bzip25-2* dependen de la pérdida de función de bZIP25 para responder a esta droga. De esta forma estos dos grupos de genes cobran relevancia para analizar la función de bZIP25.

Los DEGs que responden a BFA solo en la línea *bzip25-2* se dividen en 101 DEG (23% de los DEGs) y 339 DEG- (77% de los DEGs) (Tabla 6), mientras que en los DEG solo de las plantas silvestres hay 156 DEG+ (39.7%) y 237 DEG- (60,3%) (Tabla 6). Este análisis nos muestra que el porcentaje de DEG+ es mayor para en la planta silvestre, mientras que el porcentaje de DEG- es mayor en la línea *bzip25-2*. Los DEG+ obtenidos solo en la planta silvestre correspondería a genes que aumentan sus niveles de transcrito en el tratamiento con BFA en la planta silvestre y no cambian sus niveles en la planta *bzip25-2*, por lo tanto requieren de bZIP25 para aumentar los niveles de transcrito participando de manera directa o indirecta como un regulador positivo de estos genes en respuesta a BFA. Por otra parte, los DEG- que solo disminuyen sus niveles de transcrito en la línea *bzip25-2* dependen de la ausencia de bZIP25 para responder a BFA, por lo que bZIP25 también actuaría como un regulador positivo de estos, probablemente manteniendo los niveles basales de transcrito. Por otra parte, la mayor incidencia de DEG+ en respuesta a BFA en la línea deficiente de bZIP25 indica la relevancia que este factor tiene como un regulador negativo de estos genes de tal forma que al no estar presente es posible la inducción de estos genes en respuesta a BFA. Esto es concordante con lo observado en los análisis de transcripción global descrito anteriormente.

En cuanto a las conexiones de los DEG que cambian sus niveles de transcrito en respuesta a BFA solo en la línea silvestre o en la línea *bzip25-2* con las redes de

interacción encontramos proporciones similares de DEG conectados a la Red Transcripcional y a la Red de Co-expresión (Tabla 4). Interesantemente la mayor proporción de DEG que codifican para genes de tráfico está entre los DEG que solo cambian en la línea *bzip25-2*, correspondiente a 11 genes (2.5% de los DEG; 4 DEG+ y 7 DEG-), mientras no se encontraron genes de tráfico que cambiaran sus niveles de transcrito únicamente en la planta silvestre, indicando que la ausencia de bZIP25 permite provocar más cambios en los niveles de transcrito de genes de tráfico. (Tabla 4). Mientras que en los DEG que cambian sus niveles de transcrito tanto en la planta silvestre como en la línea deficiente de bZIP25 se encontraron 5 genes de tráfico, correspondiente al 1.1% de estos DEG (1 DEG+ y 4 DEG-, Tabla 3). Esta proporción menor de genes de tráfico indica que los cambio independiente de la presencia bZIP25 son menores que los cambio que ocurren en la ausencia de bZIP25, sugiriendo la relevancia de la función de bZIP25 en la regulación de la expresión de los genes de tráfico. Por lo tanto, la deficiencia de bZIP25 permite generar cambios transcripcionales de genes de tráfico en respuesta a BFA, que no ocurren en la planta silvestre, indicando que bZIP25 está participando en la regulación de la transcripción de los genes de tráfico.

Entre los genes de tráfico diferencialmente expresados solo en la línea *bzip25-2* hay 7 genes disminuyen sus niveles de transcrito, sugiriendo que bZIP25 estaría regulado de manera positiva estos genes. Por otra parte, este factor de transcripción participaría en la regulación negativa de los otros 4 genes de tráfico que aumentan sus niveles de transcrito en esta línea mutante. Los 7 genes de tráfico que disminuyen sus niveles de transcrito solo en la mutante *bzip25-2* codifican para proteínas de la superfamilia ENTH/ANTH/VHS (AT1G33340, AT1G25240 y AT4G02650), 3 codifican a

proteínas de la familia exocyst subunit exo70 (AT5G58430, AT5G13990 y AT3G55150), y uno a RAB GTPase homolog H1D (AT2G22290) (Tabla 4). Por otra parte, los 4 genes de tráfico que aumentan los niveles de transcrito solo en la línea *bzip25-2* codifican a GTPasas monoméricas y reguladoras de estas: RHO-related protein from plants 9, RHO guanyl-nucleotide exchange factor 2 Arabidopsis RAC-like 9 y ADP-ribosylation factor D1B, correspondiente a los loci AT1G01700, AT1G02430, AT2G44690 y AT4G28950, respectivamente (Tabla 4). Es interesante que dentro de este grupo de genes están presentes varios genes que codifican para GTPasas monoméricas y proteínas reguladoras de estas, ya que este tipo de proteínas ha sido descrita como moduladores claves del tráfico vesicular de proteínas a través del sistema de endomembrana a través de la ruta endocítica y también de la ruta secretoria (Pizarro & Norambuena, 2014). Por lo tanto, cambios en los niveles de transcritos de estos genes de tráfico podrían estar involucrados en la distinta sensibilidad y resistencia que presenta la línea deficiente de bZIP25 a nivel celular y fisiológico a BFA (Figura 16 y 18).

Adicionalmente, realizamos un análisis de sobre-representación de etiquetas en los DEG obtenidos en cada uno de los análisis anteriores utilizando la herramienta *Functional Distribution of gene list* del sitio web del Institute of Bioinformatics and System Biology MIPS del HelmholtzZentrum-München (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>) cuyos resultados son presentados en la tabla 7 y 8. Solo en el conjunto de DEG obtenidos en respuesta a BFA que cambiaron sus niveles de transcrito únicamente en mutante *bzip25-2* se encuentra sobre-representada las etiquetas “*export and secretion vesicular*”, “*vesicle docking celular*”, “*cellular export*” y “*exocytosis*”. Esta etiqueta no aparece sobre-representada en ninguno de los otros

grupos de DEG dando soporte a la evidencia que indica la participación de bZIP25 en la regulación del tráfico de proteínas a través del sistema de endomembrana. Las etiquetas con mayores índices de sobre-representación en los DEG entre la línea *bzip25-2* y la línea silvestre en la condición control son “*regulator of G-protein signaling*”, “*mRNA editing*” y “*nitrate transport*” (Tabla 7), entre estas es interesante la aparición de la etiqueta “*regulator of G-protein signaling*” ya que esta etiqueta incluye a GTPasas monoméricas como las proteínas, Arf/Sar1 y Rabs, y sus reguladores GEFs y GAPs. Los DEG encontrados entre la línea mutante *bzip25-2* y la planta silvestre en el tratamiento con BFA se encontró que las etiquetas más sobre-representadas son “*biosynthesis of asparagine/phenylalanine/tyrosine*”, “*siderophore-iron transport*” y “*induction of apoptosis*”. En base a estos resultados se sugiere que *bzip25-2* podría estar relacionado con la regulación de estos 6 procesos, puesto que la pérdida de función de bZIP25 provoca una alteración en la transcripción de genes involucrados con estos procesos en los tratamientos analizados.

En respuesta a BFA ocurren cambios en los niveles de transcrito que son comunes en la planta silvestre y en la mutante *bzip25-2*. Estos DEG tienen sobre-representadas las etiquetas “*mechanical stimulus perception and response*”, “*nitrate transport*” y “*sulfate/sulfite transport*”, y por lo tanto constituyen procesos biológicos que son parte de la respuesta a BFA que no depende de la presencia o ausencia de bZIP25. Por otra parte, los DEG que fueron encontrados en la respuesta a BFA solo en la planta silvestre requerirían de la presencia de bZIP25 para que su transcripción sea modificada. Las etiqueta con mayores índices de sobre-representación en este grupo de DEG son “*degradation of proline/tyrosine*”, “*receptor binding*” y “*diterpenes metabolism*”. En contraste, los DEG que fueron encontrados en la respuesta a BFA

Tabla 7: Resumen de las etiquetas Gene Ontology más sobre-representadas entre los DEG de las condiciones analizadas en el análisis transcriptómico.

Se realizó un análisis de enriquecimiento de etiquetas utilizando la herramienta Functional Distribution of gene list del sitio web del Institute of Bioinformatics and System Biology MIPS del HelmholtzZentrum-München (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>). Se muestran las 3 etiquetas más sobre-representadas de los DEG de las distintas condiciones estudiadas en el análisis de secuenciación masiva de RNA. Se utilizaran las siguientes abreviaciones para identificar los distintos DEG: **bZ/WT CTL** cuando corresponde a un DEG entre la línea mutante *bzip25-2* y la línea silvestre en la condición control, **bZ/WT BFA** cuando corresponde a un DEG entre la línea mutante *bzip25-2* y la línea silvestre en el tratamiento con BFA, **BFA/CTL bZ** cuando corresponde a un DEG entre el tratamiento con BFA y la condición control que solo cambian en la planta *bzip25-2*; **BFA/CTL Wt** cuando es un DEG entre el tratamiento con BFA y la condición control que solo cambian en la planta silvestres y **BFA/CTL** cuando el DEG observado entre el tratamiento con BFA y la condición control cambia tanto en la planta silvestre y como en la mutante *bzip25-2*.

DEG entre	Etiquetas más sobre-representadas
<i>bZ/WT CTL</i>	regulator of G-protein signaling
	mRNA editing
	nitrate transport
<i>bZ/WT BFA</i>	biosynthesis of asparagine/phenylalanine/tyrosine
	siderophore-iron transport
	induction of apoptosis
<i>BFA/CTL bZ</i>	rRNA synthesis
	detoxification by modification
	nitrate transport
<i>BFA/CTL Wt</i>	degradation of proline/tyrosine
	receptor binding
	diterpenes metabolism
<i>BFA/CTL</i>	mechanical stimulus perception and response
	nitrate transport
	sulfate/sulfite transport

únicamente en la línea mutante necesitaría de la ausencia de bZIP25 para que ocurra el cambio en los niveles de transcrito. En este caso el análisis de sobre-representación de etiquetas muestra que las más sobre-representadas son "rRNA synthesis", "detoxification by modification" y "nitrate transport". La aparición de la etiqueta "detoxification by modification" es interesante ya que esta función biológica podría tener relación con la sensibilidad diferencial a BFA que presenta la línea mutante *bzip25-2*.

En base a estos resultados obtenidos del análisis transcriptómico observamos que bZIP25 sería importante para la regulación de otros genes de tráfico como lo indica el aumento del nivel de transcrito del regulador de GTPasa monomérica de tipo Rho GDP-dissociation inhibitor activity protein y una proteína epsina de la familia ENTH/VHS/GAT en la mutante deficiente de bZIP2 comparado con la planta silvestre en la condición control. Además encontramos que en respuesta a BFA hay un cambio de los niveles de transcrito de 11 genes de tráfico que únicamente ocurre en la línea mutante *bzip25-2*. Este resultado acompañado con la presencia de las etiquetas *vesicle docking*, *vesicle fusion* y *vesicular cellular export* sobre-representada en el análisis de sobre-representación de los DEG en respuesta a BFA que solo cambian en la mutante deficiente de bZIP25 apoyan la hipótesis que indica que bZIP25 participa en la regulación del tráfico, mediante la regulación de la expresión de genes de tráfico.

4. DISCUSIÓN

Capacidad predictiva de la Red Regulatoria del Tráfico

En esta tesis se logró comprobar que uno de los factores de transcripción altamente conectados en la Red Regulatoria del Tráfico es capaz de regular negativamente ciertas vías de tráfico, particularmente vías endocíticas. En este contexto en esta tesis se describe la participación de bZIP25 como un regulador negativo de la ruta endocítica, donde bZIP25 está involucrado en la regulación de la endocitosis desde la membrana plasmática a endosomas y de compartimentos endosomales a la vacuola. Adicionalmente, utilizando criterios de selección basados en la conectividad a las redes descritas en el objetivo 1 de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico se identificó a bZIP28 como un buen candidato a regular el tráfico de proteínas a través del sistema de endomembrana. bZIP28 ha sido previamente descrito como un regulador de la respuesta a estrés de retículo endoplasmático, donde es regulada la expresión de genes de tráfico secretorio, tal como *SARA1*, y de esta forma se podría estar regulando la ruta secretoria (Hayashi et al, 2013). Esto nos muestra que la Red Regulatoria del tráfico y nuestros criterios de selección son capaces de identificar factores de transcripción involucrados en este proceso.

Por otra parte, NAC017 y NTL9, dos de los otros factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico que fueron seleccionados como candidatos a regular el tráfico de proteínas, utilizando los criterios de selección descritos en el Objetivo 1, también cumplen un papel en la regulación del tráfico endocítico. Esto se concluye a partir de los resultados del Seminario de Título de la alumna de Ingeniería en Biotecnología Molecular Claudia González en nuestro laboratorio. En esta tesis se estudió la endocitosis de la membrana plasmática marcada con el trazador FM4-64 en dos alelos mutantes de cada uno de estos factores de transcripción, NAC017 y NTL9, observando la alteración de ruta endocítica, particularmente el tráfico a vacuola desde endosomas. NAC017 participaría en la regulación de esta vía como un regulador negativo, mientras NTL9 actuaría como un regulador positivo de la vía. De esta forma, la selección utilizando los criterios descritos en el objetivo 1 y estudio de los factores de transcripción bZIP25, NAC017, NTL9 y bZIP28 (Liu et al., 2007), nos muestra que la Red Regulatoria del Tráfico es una poderosa herramienta para la identificación de factores de transcripción relevantes en la regulación del tráfico de proteínas a través del sistema de endomembrana. Con lo que ha sido posible identificar los primeros reguladores de la ruta endocítica hasta la fecha dando relevancia a la línea de investigación que esta tesis comienza, así como al poder predictivo que la biología de sistemas tiene al abordar sistemas esenciales como es el tráfico de proteínas.

La Red Regulatoria del Tráfico predice 13 genes de tráfico como putativos blancos de bZIP25 (Tabla 7). Se determinaron los niveles de transcrito de tres de ellos, donde se observó que los niveles de *ARA6* aumentan, mientras de *SYP122* y *SYP71* presenta una tendencia al alza, presentando un *p-value* mayor a 0,05 y menor a 0,1, a pesar que el cambio no es significativo (Figura 20). Esto nos muestra que la Red

Regulatoria del tráfico si tiene una capacidad predictiva de los genes blancos, aún considerando que los cambios de los niveles de transcrito no fueron drásticos. El nivel de cambio de los niveles de transcrito puede explicar que en los resultados de secuenciación masiva no fueron detectados pese a que se observó un cambio en el número de lecturas en la mayoría de ellos (Tabla 7). Adicionalmente, el análisis transcriptómico global identificó 2 genes de tráfico que no están conectados a bZIP25 en la Red Transcripcional pero que aumentan sus niveles de transcritos en la mutante deficiente de bZIP25. Estos corresponden a los genes AT1G25240 y AT1G12070, los cuales codifican a una proteína de la familia ENTH/VHS/GAT y a una proteína inhibitoria de la disociación de guanosina nucleótido (GDI, Guanosine nucleotide dissociation inhibitors) de Rho (www.arabdopsis.org). El que estos genes estén siendo regulados por bZIP25 pese a no estar conectados a esta factor en la Red Regulatoria puede ser efecto de que la regulación sea indirecta, mediada por otro factor de transcripción cuyos niveles de transcritos dependan de bZIP25. Otra alternativa es que estos genes pueden estar siendo regulados por bZIP25 a través de un sitio de unión secundario de bZIP25, como ha sido descrito para diversos factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* (Franco-Zorrilla et al., 2014). Interesantemente, los genes de tráfico analizados como *SAR1A* y *CLC2*, los cuales presentaron cambios de sus niveles de transcrito en la línea deficiente de bZIP25, *bzip25-2*, están conectados a bZIP25 en la Red Transcripcional. Estos resultados apoyan la capacidad de las redes de conectividad utilizadas en esta tesis, particularmente la Red Regulatoria del Tráfico para predecir genes blanco de bZIP25 tales como *ARA6*, *SYP122*, *CLC2* y *SARA1A*. Sin embargo, esta capacidad tiene limitaciones como lo muestra el análisis de los niveles de transcrito de otros genes conectados a bZIP25 como son *SYP133*, *VPS26* y *SYP71*. Es importante considerar que bZIP25 puede estar regulando la expresión de

estos genes de tráfico en otros tejidos o estadios de desarrollo o en respuesta a estímulos que requieren de la activación o inhibición de vías de tráfico particulares, como ocurre con otros genes de tráfico en respuesta a estrés salino y patógenos (Pizarro & Norambuena, 2014). Además, no podemos descartar la participación de otro factor de transcripción que tenga una función redundante respecto a bZIP25.

Es interesante destacar la eficacia de una aproximación basada en biología de sistemas para identificar componentes claves de procesos biológicos complejos, como son los reguladores transcripcionales. Este tipo de aproximación ha sido utilizada exitosamente para la identificación de factores de transcripción y otros componentes claves en modelos animales y también en plantas (Thum et al., 2008; Sardiello et al., 2009; Canales et al., 2014; Chen et al., 2014; You et al., 2014).

Rol de bZIP25 en la regulación de la morfología del retículo endoplasmático y la vacuola.

Los análisis sugieren que bZIP25 tiene un rol en la regulación de la morfología del retículo endoplásmico (Figura 27). En los análisis transcriptómicos realizados no se encontró ningún gen diferencialmente expresado cuyo producto génico esté directamente involucrado en la modulación de la arquitectura del retículo endoplasmático como son las proteínas reticulon, atlastina, entre otras (Sparkes et al., 2009b). Sin embargo, se encontró que el gen AT1G59910 que codifica a una proteína de unión a actina del tipo FH2 (*formin homology 2*) se expresa en mayor nivel en la línea deficiente de bZIP25 que en la planta silvestre. Los cambios de los niveles de transcrito de este gen pueden tener relación con la regulación de la arquitectura del retículo endoplasmático. , Por otra parte, la mutante deficiente de bZIP25 presenta

disminuidos los niveles de transcrito de dos genes secretorios, *BiP3* y *SARA1A*, cuyos productos génicos se localizan en el retículo endoplasmático. *BiP3* participa directamente en el proceso de plegamiento de proteínas, por lo que una disminución de *BiP3* podría provocar una sobrecarga de proteínas mal plegadas y con esto estrés de retículo endoplasmático. Por otra parte, *SARA1A* participa en el tráfico de vesículas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, por lo que la disminución de su expresión también podría provocar estrés de retículo y con esto, un cambio en la morfología de este compartimento.

Adicionalmente, *bZIP25* también está involucrado en la regulación de la morfología de la vacuola, en los análisis de niveles de transcrito no encontramos genes que tengan alterados los niveles de transcrito en la línea deficiente de *bZIP25* que estén directamente involucrados en la determinación de la morfología de la vacuola. Sin embargo, esto puede ser un efecto tanto de la regulación de la endocitosis mediada por *bZIP25* como del rol que tendría este factor de transcripción en la regulación de la expresión de genes endocíticos, como del gen *FH2*.

El factor de transcripción bZIP25: un regulador negativo de la ruta endocítica.

Nuestros análisis muestran que la deficiencia de *bZIP25* provoca una aceleración de la endocitosis y el tráfico a vacuola que es revertida e incluso inhibida al restablecer la expresión de *bZIP25* de manera constitutiva. Esto confirma que el defecto de la mutante *bzip25-2* fue causado por la pérdida de función de esta proteína, lo que indica a *bZIP25* como un regulador negativo del tráfico a través de la ruta endocítica en células de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. En concordancia con esto *bZIP25* es un factor de transcripción que se expresa a nivel basal en prácticamente

todos los tejidos de la planta y durante las distintas etapas del desarrollo, presentando una mayor expresión en el tallo, raíz, flor, carpelo y polen, por lo que podría participar en la regulación del tráfico a través de la ruta endocítica en la planta completa (Weltmeier et al., 2009).

bZIP25 es un factor de transcripción capaz de unirse con el sitio de unión CACGTG presente en los promotores de los genes *At2S1*, *CRU3* y *SDH2-3* (Lara et al., 2003; Roschztardt et al., 2009). Este sitio de unión es el que estaría presente en la base de datos utilizada para la generación de la Red Transcripcional, y por lo tanto, en los genes de tráfico conectados a bZIP25 en esta red y en la Red Regulatoria del Tráfico. De esta forma, bZIP25 podría regular la expresión de genes que poseen en su promotor este sitio de unión canónico como lo son los genes *ARA6*, *SYP122* y *CLC2*. Sin embargo, es importante considerar que la mayoría de los factores de transcripción pueden interactuar con de sitios unión secundarios, de tal forma que bZIP25 podría regular otros genes blanco a través de algún sitios de unión secundario, tal como ha sido descrito para diversos factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* (Franco-Zorilla et al., 2014). Por lo que una importante proyección de esta tesis es buscar el o los sitio/s consenso presente en los genes diferencialmente expresados obtenidos en el análisis transcriptómico global para luego corroborarlo mediante un ensayo de movilidad electroforética (EMSA) o de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Considerando que los factores de transcripción del tipo bZIP funcionan como homo o heterodímeros (Jakobi et al., 2002) es importante conocer que factor de transcripción es la pareja de bZIP25 para la regulación de los genes de tráfico, si es que este fuera el caso. Se ha descrito que bZIP25 pertenece al grupo C de los factores de transcripción y como los otros factores de transcripción de este grupo puede formar

heterodímeros con los factores de transcripción bZIP del grupo S1 (Jakobi et al., 2002). Particularmente, bZIP25 es capaz de formar heterodímeros con todos los factores de transcripción del grupo S1: bZIP 1, 2, 11, 44 y 53, y con el factor de transcripción ABI3 (Lara et al., 2003; Ehlert et al., 2006). Respecto a la capacidad de bZIP25 para activar la transcripción se ha descrito que presenta una moderada/baja fuerza para activar la transcripción en un sistema reportero como homodímero, sin embargo cuando forma heterodímero con algunos de los factores de transcripción del grupo S1 aumenta su capacidad drásticamente (Lara et al., 2003; Ehlert et al., 2006; Weltmeier et al., 2006).

Nuestros ensayos no permiten determinar si esta regulación es directa o indirecta. Este es un importante punto a dilucidar, considerando que de ser directa es necesario determinar al sitio de unión de bZIP25 a través del cual bZIP25 regula a los genes de tráfico así como el factor de transcripción con el cual forma el heterodímero para dicha regulación. De ser indirecta es importante determinar qué factores de transcripción regulados por bZIP25 podrían estar regulando de manera directa los genes de tráfico.

En el análisis transcriptómico global observamos que MYB51, SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN LIKE 13, ATBS1 INTERACTING FACTOR 2, PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 6, AGAMOUS LIKE 44 y WUSCHEL RELATED HOMEBOX 9A aumentan sus niveles de transcrito en la mutante deficiente de bZIP25. Estos factores de transcripción podrían regular la expresión de los genes de tráfico de manera directa, participando así en la regulación de la expresión de genes de tráfico mediada por bZIP25 de manera indirecta. Sin embargo, el cómo se ve afectada la expresión de genes de tráfico, y su efecto en las vías de

tráfico, en mutantes de estos factores de transcripción no ha sido descrito en la actualidad.

Es importante destacar que hasta la fecha no se ha asociado a bZIP25 como regulador de algún proceso biológico. Nuestra aproximación que estudia a nivel sub-celular la función de bZIP25 ha permitido otorgarle una función como un regulador negativo del tráfico endocítico. Esto es aún más interesante si consideramos que es el primer factor de transcripción descrito en plantas que es capaz de regular el funcionamiento de la ruta endocítica. Se han descrito dos factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de genes de tráfico. El factor de transcripción de *Medicago truncatula* llamado "Regulator of Symbiosome Differentiation" regula de manera directa a un gen de tráfico que codifica para la proteína SNARE VAP721 (Sinharoy et al., 2013). Sin embargo, el efecto que tiene esta regulación sobre el sistema de endomembrana no ha sido descrito. Por otra parte, R1R2R3-Myb1/4 son factores de transcripción que dirigen la expresión de la t-SNARE KNOLLE durante el ciclo celular, por lo que mutantes con pérdida de función de estos factores de transcripción presentan un fenotipo similar al de la mutante con pérdida de función de KNOLLE (Haga et al., 2007).

Relación entre la regulación negativa de la endocitosis y cambios de los niveles de transcrito de genes endocíticos mediada por bZIP25.

Para considerar a bZIP25 como un regulador transcripcional de la ruta endocítica es necesario que existan genes de tráfico que sean genes blancos de regulación transcripcional mediada por bZIP25. En este contexto, en esta tesis se encontró que los genes *CLC2*, *ARA6* y *SYP122* son posibles blancos regulados por

bZIP25 que están relacionados con la endocitosis y el tráfico a vacuola. Estos genes aumentan sus niveles de transcrito en la mutante deficiente de bZIP25 lo cual concuerda con el rol como regulador negativo propuesto para bZIP25 (Figura 27).

CLC2 codifica a una cadena liviana de clatrina cuya función como componente de la maquinaria de tráfico endocítico desde membrana plasmática a endosomas ha sido demostrada en plantas a través del estudio de mutantes de pérdida de función (Wang et al., 2013). Estas mutantes presentan una disminución de la endocitosis de proteínas desde la membrana plasmática a compartimentos endosomales. De manera consistente se ha descrito en un modelo animal que existe una correlación directa entre la concentración de la cadena liviana de Clatrina y la tasa endocítica (Moskowitz et al., 2005). Estas evidencias en conjunto nos permiten explicar cómo la regulación negativa de la expresión de *CLC2* mediada por bZIP25 permitiría regular la endocitosis de componentes desde la membrana plasmática a compartimentos endosomales (Figura 27). La deficiencia de bZIP25 provoca un aumento de los niveles de *CLC2* y muy probablemente de su producto proteico, lo cual tendría como efecto un aumento de la endocitosis de componentes de la membrana plasmática como fue observado en la mutante *bzip25-2*. Por otra parte, *ARA6* es una GTPasa del tipo Rab5 involucrada en el tráfico desde endosoma tardío o MVB/PVC a membrana plasmática a través de la interacción con SYP121 y VAMP727 participa y permite el reciclaje de componentes de tráfico a la membrana (Ebine et al., 2011). Por lo tanto, el aumento de la expresión de *ARA6* en la deficiencia de bZIP25 permitiría incrementar el reciclaje de componentes de la maquinaria de tráfico lo que a su vez posibilitaría sostener la endocitosis acelerada desde membrana plasmática a endosomas que la mutante deficiente de bZIP25 presenta y aumentar el flujo a través de la ruta endocítica (Figura 27). De

manera similar, SYP122 es una t-SNARE de membrana plasmática asociada al tráfico de reciclaje desde endosomas a membrana plasmática por lo que su función en la ruta endocítica sería restablecer la localización de componentes de la maquinaria endocítica en la membrana plasmática a través de la interacción con VAMP721 (Figura 27) (Kato y Bai et al., 2010; Tyrrell et al., 2007).

Como fue mencionado anteriormente, el análisis transcriptómico global mostró que aumenta el nivel de transcritos del gen AT1G25240, el cual codifica para una proteína ENTH/VHS/GAT anotada en la base de datos TAIR como una proteína de cubierta de interacción a clatrina y a membrana. En base a esta anotación sugerimos que el gen codificado en el locus AT1G25240 es otro componente la maquinaria del tráfico de la ruta endocítica que es regulado por bZIP25 y que permite modificar el tráfico desde membrana plasmática a vacuola, como el observado en la mutante deficiente de bZIP25 (Figura 27). El gen codificado en el locus AT1G12070, el cual codifica a una proteína GDI de Rho y presenta mayores niveles de transcritos en la mutante deficiente de bZIP25, tiene una función asociada a la organización de los filamentos de actina según su anotación en la base de datos TAIR. Puesto que los filamentos de actina son necesarios para el tráfico celular tanto de la ruta secretoria como endocítica no es posible asociar los cambios de los niveles de transcrito de gen AT1G12070 a una vía de tráfico particular, sino más bien podría ser un efecto general en el tráfico de componentes celulares. Se ha mostrado farmacológica y genéticamente que alteraciones en el citoesqueleto pueden causar diversos grados de severidad en los fenotipos celulares y de organismos completos. Por ellos es altamente probable que el impacto en el citoesqueleto de actina debido a la deficiencia de bZIP25 sea poco severa.

Por lo tanto, observamos coherencia en la función de los productos génicos de los genes que presentan un aumento de los niveles de transcrito como *ARA6*, *CLC2*, *SYP122* y *AT1G25240* y la aceleración de la endocitosis y del tráfico a vacuola en la línea deficiente de *bZIP25*, dando soporte al rol como regulador negativo directo o indirecto del tráfico a través de la ruta endocítica de *bZIP25*.

Adicionalmente, *bZIP25* también participaría en la regulación de genes de tráfico involucrados en la ruta secretoria como *SARA1A*, *BiP3* y *SYP71*. Se ha descrito que la GTPasa monomérica *SARA1A* se localiza en los sitios de exportación a retículo endoplasmático y participaría en el tráfico de proteínas desde este compartimento al aparato de Golgi (Hanton et al., 2008). Por lo tanto un aumento de los niveles de transcrito de *SARA1A*, y consecuente aumento de niveles de proteínas, podría facilitar la formación de vesicular cargadas con proteínas y de esta forma el flujo. Por otra parte, *SYP71* ha sido descrita como una t-SNARE de retículo endoplasmático que participaría en la recepción de vesículas provenientes desde el Aparato de Golgi (Moreau et al., 2007). De esta forma *SYP71* participaría en el tráfico retrógrado desde el aparato de Golgi a retículo endoplasmático, lo cual es necesario para la relocalización en el retículo endoplasmático de la maquinaria de tráfico involucrada en el tráfico desde retículo endoplasmático a aparato de Golgi. Respecto a *BiP3* es una proteína chaperona del sistema de endomembrana que participa en plegamiento de proteínas, y además forma parte de los componentes de señalización del estrés de retículo endoplasmático. Si bien *BiP3* no corresponde directamente a un componente de la maquinaria de tráfico es una proteína importante para el funcionamiento del sistema de endomembrana, particularmente del retículo endoplasmático (Srivastava et al., 2013). El efecto que la regulación de *BiP3* tendría sobre el tráfico a través de la

ruta secretoria no ha sido determinado. Sin embargo la mutante deficiente de bZIP25 presenta una alteración en la morfología del retículo endoplasmático lo que nos entrega indicios acerca del posible rol de bZIP25 en la regulación de la ruta secretoria.

Interesantemente, se ha descrito que SYP71 presentaría una localización dual y una función de t-SNARE en la membrana plasmática participando en la recepción de vesículas provenientes desde endosomas como EE/TGN (Suwastika et al., 2008; Tyrrell et al., 2007). Por lo tanto, SYP71 en la membrana plasmática podría permitir el restablecimiento de la maquinaria de tráfico endocítico en la membrana plasmática cumpliendo una función similar a la propuesta para SYP122 en la ruta endocítica en concordancia con el fenotipo de endocitosis acelerada encontrado en la mutante deficiente de bZIP25.

Sensibilidad diferencial a BFA y Wm en la línea deficiente de bZIP25.

La deficiencia de bZIP25 provoca una respuesta a BFA y a Wm distinta a la observada en plantas silvestres a nivel celular, lo que es acompañado de una menor sensibilidad a nivel de planta completa. Esto puede deberse a un efecto del mayor tráfico endocítico el cual podría compensar el efecto de estas drogas.

En respuesta a BFA SYP122 y SYP71 presentan mayores niveles de transcritos en la mutante deficiente de bZIP25 y podrían estar facilitando la recepción de vesículas en la membrana plasmática pudiendo aumentar el tráfico desde endosomas a la membrana plasmática y de esta forma compensando la inhibición mediada por BFA. En este mismo sentido y en base a que se ha descrito que el tráfico desde EE/TGN a membrana plasmática ocurre a través de vesículas cubiertas de clatrina (Chen et al.,

2011), muy probablemente la inducción de *CLC2* en el tratamiento con BFA también facilitaría el tráfico desde endosomas a membrana plasmática aportando a la sensibilidad diferencial a BFA.

Por otra parte, la sensibilidad diferencial a BFA presentada por la línea deficiente de *bZIP25* podría ser efecto del rol regulatorio que tendría *bZIP25* en la ruta secretoria, la cual también es inhibida por BFA a nivel del tráfico entre retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Robinson et al., 2008). En este contexto la mutante *bzip25-2* presentaría una sensibilidad diferente en base a los menores niveles de transcrito de *SARA1A* y de *BiP3* que presenta en comparación a la planta silvestre, siendo menos eficiente en el montaje de la respuesta al estrés de retículo que es provocado por esta droga. Sin embargo, de ser este el motivo se esperaría una mayor sensibilidad a BFA a nivel de planta completa al no ser capaz de responder eficientemente al estrés de retículo endoplasmático, como ocurre en la mutante deficiente de *bZIP28*, un regulador positivo de la respuesta a estrés de retículo endoplasmático (Liu et al., 2007).

La sensibilidad diferencial observada en respuesta a *Wm* a nivel celular y a nivel de planta completa se puede explicar por los cambios de los niveles de transcrito de los genes de tráfico endocítico tales como *ARA6* y *CLC2* en la planta deficiente de *bZIP25* lo que aumentaría la endocitosis y el flujo del tráfico a vacuola como fue observado en este tratamiento y en el tratamiento control en la línea deficiente de *bZIP25*. Otra posibilidad es que los niveles de transcrito de los genes blancos de *Wm*, *PI3* quinasas y *PI4* quinasas, o los genes blancos de BFA, determinadas proteínas *ARF-GEF*, sean mayores en la línea deficiente de *bZIP25*. Por lo tanto, las concentraciones de drogas utilizadas no permitirían la inhibición completa de las vías

de tráfico donde participar estas enzimas provocando una diferencia en la sensibilidad a estas drogas.

La sensibilidad diferencial observada a nivel celular a las drogas que alteran el tráfico endocítico, BFA y Wm, apoya el rol de bZIP25 como un regulador de las vías de tráfico endocítico. El aumento de los niveles de transcrito frente a estas drogas en la línea deficiente de bZIP25 de algunos genes de endocíticos es consistente con el rol como regulador negativo que hemos mostrado de bZIP25.

Efecto fisiológico de la regulación de la endocitosis mediada por bZIP25: Raíces laterales y resistencia a salinidad.

La línea deficiente de bZIP25 que tiene acelerada la endocitosis y el tráfico a vacuola presenta una correlación con dos procesos fisiológicos relacionados con el tráfico endocítico como son: la inducción de raíces laterales y la tolerancia a salinidad. Se ha descrito que la aceleración del tráfico a vacuola mediante el uso del compuesto Sortin2 genera un aumento de la densidad de raíces laterales que es independiente del complejo SCF^{TIR} (Pérez-Henríquez et al., 2012). Este efecto también se observa en la mutante deficiente de bZIP25 la que presenta una mayor densidad de raíces laterales respecto a la planta control. Este resultado muestra una correlación directa entre un fenotipo asociado a la aceleración del tráfico hacia la vacuola y la función de bZIP25, sugiriendo que el rol regulatorio de bZIP25 sobre el tráfico a vacuola y la endocitosis podría tener un efecto sobre la regulación de la arquitectura de la raíz (Figura 27). Adicionalmente, el análisis transcriptómico mostró la disminución del nivel de transcrito

del gen *NRT2.1*. *NRT2.1* es una proteína de membrana que participa en la regulación del desarrollo de las raíces laterales, actuando como un regulador negativo en respuesta a cambios nutricionales del medio (Little et al., 2005). En este contexto, la participación de *bZIP25* en la regulación del desarrollo de raíces laterales podría ocurrir a través de *NRT2.1*, a través de la regulación de la endocitosis o mediante un sistema combinado (Figura 27).

Por otra parte, se ha descrito que la sobre expresión de genes de tráfico que codifican para componentes de la maquinaria de tráfico a vacuola presentan mayor tolerancia a salinidad (Mazel et al., 2004; Leshem et al., 2006; Kim et al, 2011). Particularmente se ha descrito que la mutante de *ARA6* presenta menor tolerancia a salinidad y que la expresión de una versión constitutivamente activa de la GTPasa monomérica *ARA6* otorga mayor tolerancia a salinidad (Ebine et al, 2011). En relación a esto el aumento de tolerancia en la línea deficiente de *bZIP25* puede ser correlacionado con la regulación de *bZIP25* sobre *ARA6* y con el aumento de los niveles de transcrito de *ARA6* en esta línea mutante. Adicionalmente, se ha descrito que mutantes que presentan acelerada la endocitosis presentan resistencia a salinidad (Golani et al, 2013). Este efecto es análogo al que observamos en la línea deficiente de *bZIP25* sugiriendo que la tolerancia a salinidad es efecto de la aceleración de la endocitosis. Por lo tanto, la regulación que *bZIP25* tendría sobre los genes *ARA6*, *CLC2*, *SYP122* y *AT1G25240* y la función de ellos en el proceso de endocitosis y tráfico a vacuola podrían estar directamente ligados a la sensibilidad a salinidad (Figura 27).

En resumen, esta tesis muestra evidencia celular, farmacológica, transcripcional y fisiológica que sugiere a bZIP25 como un regulador negativo del tráfico endocítico y de procesos asociados a esta función.

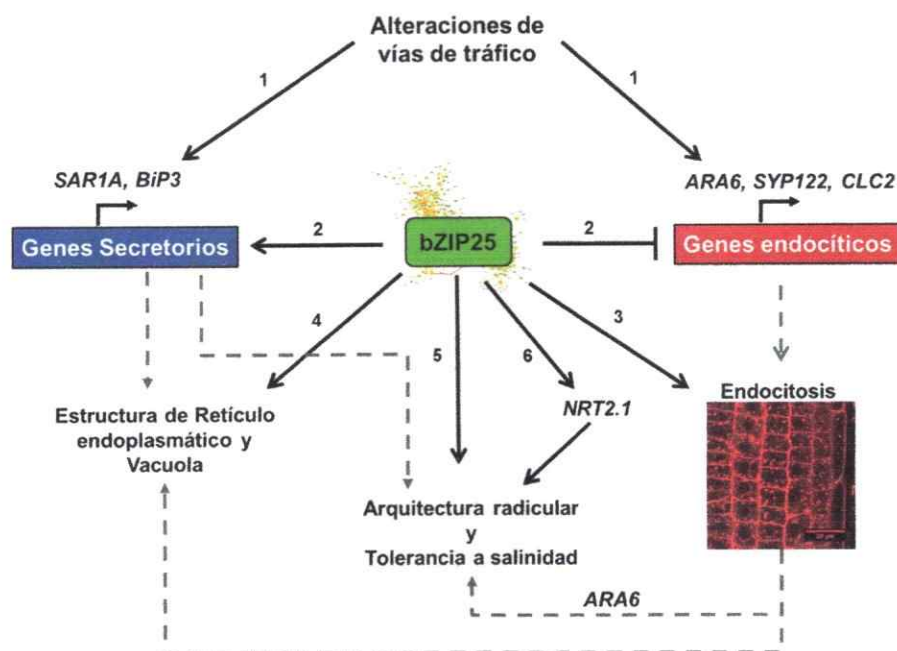


Figura 27: Modelo de las funciones regulatorias de bZIP25.

En respuesta a alteraciones del funcionamiento de vías de tráfico se producen cambios transcripcionales de genes de tráfico de tipo secretorios y endocíticos (1). bZIP25 un factor altamente conectado en la Red Regulatoria del Tráfico participa en la regulación de la expresión de estos genes en condición control o en respuesta a la alteración de vías de tráfico, actuando como un regulador positivo de genes secretorios y negativo de genes endocíticos (2). bZIP25 esta involucrado en la regulación de la endocitosis actuando como un regulador negativo de ésta (3). bZIP25 participa en la regulación de la morfología del retículo endoplasmático y de la vacuola (4). En términos fisiológicos bZIP25 participa como un regulador negativo del desarrollo de raíces laterales y de la tolerancia a salinidad (5). bZIP25 regula la expresion del regulador negativo del desarrollo de raíces lateral NRT2.1 (6). Se propone que la regulación transcripcional, mediada por bZIP25, de genes endocíticos como ARA6 y CLC2, dado el role de estos en la endocitosis (Ebine et al, 2011; Wang et al., 2013), esta directamente relacionada con la regulación de la endocitosis. Adicionalmente, se sugiere que la regulación de la endocitosis tendría una participación en el rol regulatorio de bZIP25 sobre la morfología del retículo endoplasmático y la vacuola, asi como la arquitectura de la raíz y la tolerancia a salinidad (Golani et al., 2013; Pérez-Henriquez et al., 2012; Ebine et al, 2011).

5. CONCLUSIONES

- A través del análisis de la Red Regulatoria del Tráfico se identificaron factores de transcripción capaces de regular el sistema de endomembrana. A través del análisis topológico y de la jerarquización de los factores de transcripción de la Red Regulatoria del Tráfico se seleccionaron siete factores de transcripción candidatos: dos factores de transcripción del tipo bZIP, bZIP25 (AT3G54620) y bZIP28 (AT3G10800); dos factores de transcripción del tipo NAC, ANAC017 (AT1G34190) y NTL9 (AT4G35580); y tres factores de transcripción del tipo bHLH AT4G02590, AT5G46760 y AT1G03040.
- Los criterios de selección utilizados para la búsqueda de los factores de transcripción candidatos fueron eficaces y pertinentes para la selección de factores de transcripción que regulan el funcionamiento del sistema de endomembranas y el tráfico de componentes a través de él.

- En esta tesis se describe que el factor de transcripción bZIP25 participa en la regulación de compartimentos del sistema de endomembranas, particularmente en la morfología del retículo endoplasmático y de la vacuola.
- bZIP25 es un regulador negativo de la endocitosis y del tráfico a vacuola
- bZIP25 regula de manera negativa la expresión de genes de tráfico, particularmente genes involucrados en el tráfico endocítico tanto en condiciones normales como en respuesta a la alteración de vías endocíticas específicas, indicando que bZIP25 participaría en la regulación de estas vías de tráfico en respuesta a cambios en los requerimientos celulares.
- bZIP25 está también involucrado en la regulación de otros procesos fisiológicos tales como: la señalización de proteínas G, edición de mRNA, el transporte de Nitrato, biosíntesis de aminoácidos, inducción de apoptosis y síntesis de rRNA.
- La función de bZIP25 impacta en la regulación de procesos fisiológicos relacionados a la endocitosis tales como el desarrollo de las raíces laterales y la resistencia a salinidad.
- Por lo tanto, a través del análisis de la Red Regulatoria del Tráfico se identificaron factores de transcripción capaces de regular el sistema de endomembrana.

6. PROYECCIONES

Identificación del sitio de unión al DNA de los blancos regulatorios directos del bZIP25.

La mutante deficiente de bZIP25 presenta una aceleración de la ruta endocítica, tanto a nivel del tráfico desde membrana plasmática a endosomas como desde endosomas, EE/TGN o MVB/PVC, a vacuola y no observamos cambios de los niveles de transcrito de los genes de tráfico que codifican para componentes de la maquinaria de tráfico desde MVB/PVC a vacuola en la mutante deficiente de bZIP25. Por lo que sería importante identificar blancos candidatos de bZIP25 que estén directamente involucrados con el tráfico desde PVC a vacuola. Para esto podemos utilizar dos estrategias complementarias: 1) Identificación del sitio de unión putativo de bZIP25 en los genes de tráfico involucrados en el tráfico desde MVB/PVC a vacuola, a través de la búsqueda el motivo repetido (Logo) entre los genes que cambian los niveles de transcrito en la mutante deficiente de bZIP25. 2) Determinación de los niveles de transcritos de genes de tráfico asociados al tráfico desde membrana plasmática a vacuola en la mutante deficiente de bZIP25 tales como, ARA7, RHA1, VAMP727, VTI11 o VTI12, y con particular interés aquellos que están conectados a bZIP25 como son CLC3, ARFC1, VPS20 y Miosina 2.

Identificación del factor de transcripción que forma el heterodímero con bZIP25 y participa en la regulación del tráfico endocítico desde la membrana plasmática a vacuola.

La identificación de la pareja de bZIP25 puede ser abordada a través del análisis de la endocitosis y los niveles de transcrito de genes de tráfico que son blancos de bZIP25, como *CLC2* y *ARA6*, en líneas mutantes de los factores de transcripción del grupo S1 así como en las dobles mutantes de estos factores y la línea *bzip25-2*. Donde se espera encontrar fenotipos similares en la simple mutante del factor de transcripción acompañante de bZIP25 y exacerbado en la doble mutante si es que hay redundancia funcional. Sin embargo, se debe considerar que una fuerte alteración del tráfico endocítico podría generar una severa deficiencia en el funcionamiento celular poniendo en riesgo la viabilidad de las plantas.

Analizar el rol regulatorio de bZIP25 en la regulación del tráfico secretorio.

La deficiencia de bZIP25 provoca cambios en el nivel de transcrito de genes secretorios en condición control y en respuesta a la inhibición mediada por BFA, sugiriendo que este factor de transcripción podría actuar como un regulador positivo de estos genes de tráfico y las vías secretorias. Esta observación es apoyada por los resultados de secuenciación de RNA que nos indica que bZIP25 actuaría como un regulador positivo de genes de tráfico asociados al funcionamiento del retículo endoplasmático y a formación de vesículas como son los genes tráfico que codifican a proteínas del tipo ENTH/ANTH/VHS. Sin embargo, para verificar esto se debería analizar la respuesta de esta mutante frente a otras drogas que alteran específicamente la ruta secretoria y estudiar la secreción y destinación de algunas

proteínas como Aleurin-GFP o la secreción de componentes de la pared celular para determinar si esta vía también está siendo regulada por bZIP25.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agee AE, Surpin M, Sohn EJ, Girke T, Rosado A, Kram BW, Carter C, Wentzell AM, Kliebenstein DJ, Jin HC, Park OK, Jin H, Hicks GR, Raikhel NV. 2010. MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 is an Arabidopsis myrosinase-associated protein involved in endomembrane protein trafficking. *Plant Physiol.* 152:12032.
- Anders N, Jürgens G. 2008. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci.* 65(21):343345.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 2004. Normalization of realtime quantitative reverse transcriptionPCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64:524550.
- Albert, R. 2005. Scalefree networks in cell biology. *J. Cell Sci.* 118:49474957.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, 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, AguilarHenonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. 2003. Genomewide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science.* 301:6537.

- Anantharaman V, Aravind L. 2002. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.* 3:research0023.
- Anders N, Jürgens G. 2008. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci.* 65:343345.
- Barabási, A.L. 2009. Scalefree networks: A decade and beyond. *Science.* 325:412413.
- Barabási, A.L. y Oltvai, Z.N. Network biology: understanding the cell's functional organization. 2004. *Nat. Rev. Genet.* 5:101113.
- Bassham DC, Brandizzi F, Otegui MS, Sanderfoot AA. 2008. The secretory system of Arabidopsis. *Arabidopsis Book.* 6:e0116.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30(15):2114-20.
- Bonifacino, J.S., Glick B.S. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116: 153-166.
- Boutté Y, FrescatadaRosa M, Men S, Chow CM, Ebine K, Gustavsson A, Johansson L, Ueda T, Moore I, Jürgens G, Grebe M. 2010. Endocytosis restricts Arabidopsis KNOLLE syntaxin to the cell division plane during late cytokinesis. *EMBO J.* 29:54658.
- Canales J, Moyano TC, Villarroel E, Gutiérrez RA. 2014. Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about Arabidopsis root response to nitrate treatments. *Front Plant Sci.* 5:22.
- CevherKeskin B. 2013. ARF1 and SAR1 GTPases in endomembrane trafficking in plants. *Int J Mol Sci.* 14:1818118199.

- Chen H, Lu S, Zhou J, Bai Z, Fu H, Xu X, Yang S, Jiao B, Sun Y. 2014. An integrated approach for the identification of USF1centered transcriptional regulatory networks during liver regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 1839:415423.
- Chen X, Irani NG, Friml J. 2011. Clathrinmediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr Opin Plant Biol*. 14:67482.
- Chong YT, Gidda SK, Sanford C, Parkinson J, Mullen RT, Goring DR. 2010. Characterization of the *Arabidopsis thaliana* exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. *New Phytol*. 185:40119.
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu JL, Hükelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, SchulzeLefert P. 2003. SNAREproteinmediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*. 425:9737.
- da Silva LL, Taylor JP, Hadlington JL, Hanton SL, Snowden CJ, Fox SJ, Foresti O, Brandizzi F, Denecke J. 2005. Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell*. 17:13248.
- Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM. 2007. Linking of autophagy to ubiquitinproteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*. 171(2):51324.
- Dominguez M, Dejgaard K, Füllekrug J, Dahan S, Fazel A, Paccaud JP, Thomas DY, Bergeron JJ, Nilsson T. 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cisGolgi network bind both COP I and II coatomer. *J Cell Biol*. 140(4):75165.
- Drakakaki, G. y Dandekar, A. 2013. Protein secretion: how many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci*. 203204:7478.

- D'SouzaSchorey C, Chavrier P. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:34758.
- Ebine K, Fujimoto M, Okatani Y, Nishiyama T, Goh T, Ito E, Dainobu T, Nishitani A, Uemura T, Sato MH, ThordalChristensen H, Tsutsumi N, Nakano A, Ueda T. 2011. A membrane trafficking pathway regulated by the plantspecific RAB GTPase ARA6. *Nat Cell Biol.* 13:8539.
- Ehlert A, Weltmeier F, Wang X, Mayer CS, Smeekens S, VicenteCarbajosa J, DrögeLaser W. 2006. Twohybrid proteinprotein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J.* 46:890900.
- Falchi R, Cipriani G, Marrazzo T, Nonis A, Vizzotto G, Ruperti B. 2010. Identification and differential expression dynamics of peach small GTPases encoding genes during fruit development and ripening. *J Exp Bot.* 61:282942.
- Fendrych M, Synek L, Pecenková T, Drdová EJ, Sekeres J, de Rycke R, Nowack MK, Zársky V. 2013. Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of Arabidopsis thaliana. *Mol Biol Cell.* 24:51020.
- FrancoZorrilla JM, LópezVidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R. 2014. DNA binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:236772.
- Frei dit Frey N, Robatzek S. 2009. Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? *Curr Opin Plant Biol.* 12:43743.
- Gadeyne A, SánchezRodríguez C, Vanneste S, Di Rubbo S, Zauber H, Vanneste K, Van Leene J, De Winne N, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Cannoot B, Vercruysse L, Mayers JR, Adamowski M, Kania U, Ehrlich M, Schweighofer A, Ketelaar T, Maere S, Bednarek SY, Friml J, Gevaert K, Witters E, Russinova E,

- Persson S, De Jaeger G, Van Damme D. 2014. The TPLATE adaptor complex drives clathrin mediated endocytosis in plants. *Cell*. 156:691704.
- Gao C, Cai Y, Wang Y, Kang BH, Aniento F, Robinson DG, Jiang L. 2014. Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins. *Trends Plant Sci*. 19(8):508-15.
 - Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R. 1998. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*. 394:43-23.
 - Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Komberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G. 2003. Arabidopsis GNOM ARFGEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxindependent plant growth. *Cell*. 112:2192-30.
 - Golani Y, Kaye Y, Gilhar O, Ercetin M, Gillaspay G, Levine A. 2013. Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase9 (At5ptase9) controls plant salt tolerance by regulating endocytosis. *Mol Plant*. 6:1781-94.
 - Gutiérrez RA, Shasha DE, Coruzzi GM. 2005. Systems biology for the virtual plant. *Plant Physiol*. 138:55-04.
 - Haga N, Kato K, Murase M, Araki S, Kubo M, Demura T, Suzuki K, Müller I, Voss U, Jürgens G, Ito M. 2007. R1R2R3Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 134:1101-1110.
 - Hanton SL, Chatre L, Matheson LA, Rossi M, Held MA, Brandizzi F. 2008. Plant Sar1 isoforms with nearidentical protein sequences exhibit different localisations and effects on secretion. *Plant Mol Biol*. 67:283-94.

- Hayashi S, Wakasa Y, Takaiwa F. 2013. Recent advances in understanding the control of secretory proteins by the unfolded protein response in plants. *Int J Mol Sci.* 14:9396-9407.
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H. 2000. Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5:446-51.
- Hong W, Lev S. 2014. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol.* 24:35-43.
- Iwata Y, Koizumi N. 2012. Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci.* 17:720-7
- Jakoby M, Weisshaar B, DrögeLaser W, VicenteCarbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F; bZIP Research Group. 2002. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 7:106-11.
- Kamauchi S, Nakatani H, Nakano C, Urade R. 2005. Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 272(13):3461-76.
- Kato N, Bai H. 2010. Expression, localization and interaction of SNARE proteins in *Arabidopsis* are selectively altered by the dark. *Plant Signal Behav.* 5:147-02.
- Kesarwani, M., Yoo, J., Dong, X. 2007. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesisrelated genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144:336346.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14:R36.
- Kim SJ, Bassham DC. 2011. TNO1 is involved in salt tolerance and vacuolar trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156:514-26.

- Kleine-Vehn, J., Leitner, J., Zwiewka, M., Sauer, M., Abas, L., Luschnig, C. y Friml, J. 2008. Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromerdependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:17812-17817.
- Krizek, B.A. 2011. Aintegumenta and AintegumentaLike6 regulate auxinmediated flower development in Arabidopsis. *BMC Res Notes.* 4:176.
- Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, El Kasmi F, Jürgens G, Parker J, Panstruga R, Lipka V, SchulzeLefert P. 2008. Cooption of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature.* 451:83540.
- Lara P, OñateSánchez L, Abraham Z, Ferrándiz C, Díaz I, Carbonero P, VicenteCarbajosa J. 2003. Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J Biol Chem.* 278:21003-11.
- Lee GJ, Kim H, Kang H, Jang M, Lee DW, Lee S, Hwang I. 2007. EpsinR2 interacts with clathrin, adaptor protein3, AtVTI12, and phosphatidylinositol3phosphate. Implications for EpsinR2 function in protein trafficking in plant cells. *Plant Physiol.* 143:156-175.
- Legendre-Guillemain V, Wasiak S, Hussain NK, Angers A, McPherson PS. 2004. ENTH/ANTH proteins and clathrinmediated membrane budding. *J Cell Sci.* 117:918.
- Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A. 2006. Suppression of Arabidopsis vesicleSNARE expression inhibited fusion of H2O2containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18008-13.

- Li S, van Os GM, Ren S, Yu D, Ketelaar T, Emons AM, Liu CM. 2010. Expression and functional analyses of EXO70 genes in Arabidopsis implicate their roles in regulating cell typespecific exocytosis. *Plant Physiol.* 154:1819-30. Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE. 2005. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13693-8.
- Lipka V, Kwon C, Panstruga R. 2007. SNAREware: the role of SNAREdomain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:147-74.
- Liu J, Srivastava, Che P, Howell S. 2007. An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic precessing and nuclear relocation of a membraneassociated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell.* 19:4111-4119.
- Liu JX, Howell SH. 2010. bZIP28 and NFY transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 22(3):782-96.
- Lota F, Wegmüller S, Buer B, Sato S, Bräutigam A, Hanf B, Bucher M. 2013. The cisacting CTTCP1BS module is indicative for gene function of LjVTI12, a QbSNARE protein gene that is required for arbuscule formation in Lotus japonicus. *Plant J.* 74:280-93.
- Marion J, Bach L, Bellec Y, Meyer C, Gissot L, Faure JD. 2008. Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using highthroughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *Plant J.* 56:169-79.
- Martínez IM, Chrispeels MJ. 2003. Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell.* 15(2):561-76.

- Mazel A, Leshem Y, Tiwari BS, Levine A. 2004. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol.* 134:118-28.
- Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, Puri C, Pignata A, Martina JA, Sardiello M, Palmieri M, Polishchuk R, Puertollano R, Ballabio A. 2011. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell.* 21:421-30.
- Mewes HW, Dietmann S, Frishman D, Gregory R, Mannhaupt G, Mayer KF, Münsterkötter M, Ruepp A, Spannagl M, Stümpflen V, Rattei T. 2008. MIPS: analysis and annotation of genome information in 2007. *Nucleic Acids Res.* 36:D196-201.
- Montesinos JC, Sturm S, Langhans M, Hillmer S, Marcote MJ, Robinson DG, Aniento F. 2012. Coupled transport of Arabidopsis p24 proteins at the ERGolgi interface. *J Exp Bot.* 63:4243-61.
- Moreau P, Brandizzi F, Hanton S, Chatre L, Melser S, Hawes C, Satiat-Jeunemaitre B. 2007. The plant ERGolgi interface: a highly structured and dynamic membrane complex. *J Exp Bot.* 58:49-64.
- Moskowitz HS, Yokoyama CT, Ryan TA. 2005. Highly cooperative control of endocytosis by clathrin. *Mol Biol Cell.* 16:1769-76.
- Mudunkothge, J.S., Krizek, B.A. 2012. Three Arabidopsis AIL/PLT genes act in combination to regulate shoot apical meristem function. *Plant J.* 71:108121.
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T. 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng.* 104:34-41.

- Nakajima Y, Yoshida S, Inoue Y, Ono T. 1996. Occupation of the QB-binding pocket by a photosystem II inhibitor triggers dark cleavage of the D1 protein subjected to brief preillumination. *J Biol Chem.* 271(29):173839.
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A. 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for colocalization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* 51:11261136.
- Nero D, Katari MS, Kelfer J, Tranchina D, Coruzzi GM. 2009. In silico evaluation of predicted regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Bioinformatics.* 10:435.
- Niu TK, Pfeifer AC, Lippincott-Schwartz J, Jackson CL. 2005 Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell.* 16:1213-22.
- Pecenková T, Hála M, Kulich I, Kocourková D, Drdová E, Fendrych M, Toupalová H, Zársky V. 2011. The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *J Exp Bot.* 62:2107-16.
- Paciorek T, Zazimalová E, Ruthardt N, Petrásek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jürgens G, Geldner N, Friml J. 2005. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature.* 435(7046):1251-6.
- Pérez-Henríquez P, Raikhel NV, Norambuena L. 2012. Endocytic trafficking towards the vacuole plays a key role in the auxin receptor SCFTIR-independent mechanism of lateral root formation in *A. thaliana*. *Mol Plant.* 5:1195209
- Petrásek J, Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development.* 136(16):2675-88.
- Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker J, Cherfils J, Jackson CL. 1999. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARFGDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell.* 3:275-85.

- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in realtime RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Pfeffer SR. 2013. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr Opin Cell Biol.* 25:4149.
- Pimpl P, Taylor JP, Snowden C, Hillmer S, Robinson DG, Denecke J. 2006. Golgimediated vacuolar sorting of the endoplasmic reticulum chaperone BiP may play an active role in quality control within the secretory pathway. *Plant Cell.* 18:198-211.
- Pizarro L, Norambuena L. 2014. Regulation of protein trafficking: posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant Sci.* 225:24-33.
- Pucadyil TJ, Schmid SL. 2009. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science.* 325:1217-20.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. 2003. Assumptionfree analysis of quantitative realtime polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 339:626.
- Reyes F.C., Buono R. y Otegui M.S. 2011. Plant endosomal trafficking pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:666-73.
- Richter S, Geldner N, Schrader J, Wolters H, Stierhof YD, Rios G, Koncz C, Robinson D, Jürgens G. 2007. Functional diversification of closely related ARFGEFs in protein secretion and recycling. *Nature.* 448:488-492.
- Rivera-Serrano EE, Rodriguez-Welsh MF, Hicks GR, RojasPierce M. 2012. A small molecule inhibitor partitions two distinct pathways for trafficking of tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *PLoS One.* 7:e44735.
- Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, Vanneste S, Zhang J, Simon S, Čovanová M, Hayashi K, Dhonukshe P, Yang Z, Bednarek SY,

- Jones AM, Luschnig C, Aniento F, Zažímalová E, Friml J. 2010. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrindependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* 143(1):1111-21.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26:139-40.
 - Ron D, Walter P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:519-29.
 - Rosado A, Hicks GR, Norambuena L, Rogachev I, Meir S, Pourcel L, Zouhar J, Brown MQ, Boirsdore MP, Puckrin RS, Cutler SR, Rojo E, Aharoni A, Raikhel NV. 2011. Sortin1hypersensitive mutants link vacuolartrafficking defects and flavonoid metabolism in Arabidopsis vegetative tissues. *Chem Biol*. 18(2):187-97.
 - Roschztardt H, Fuentes I, Vásquez M, Corvalán C, León G, Gómez I, Araya A, Holuigue L, VicenteCarbajosa J, Jordana X. 2009. A nuclear gene encoding the ironsulfur subunit of mitochondrial complex II is regulated by B3 domain transcription factors during seed development in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 150:84-95.
 - Sanderfoot A. 2007. Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *Plant Physiol*. 144:617.
 - Sanderfoot AA, Raikhel NV. 1999. The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell*. 11:629-42.
 - Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 325:473-7.

- Sata M, Moss J, Vaughan M. 1999. Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(6):2752-7.
- Scheuring D, Künzl F, Viotti C, Yan MS, Jiang L, Schellmann S, Robinson DG, Pimpl P. 2012. Ubiquitin initiates sorting of Golgi and plasma membrane proteins into the vacuolar degradation pathway. *BMC Plant Biol.* 12:164.
- Schmid EM, McMahon HT. 2007. Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature.* 448:883-888.
- Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. 2005. *Annu Rev Biochem* 74: 739-89.
- Schweizer F, FernándezCalvo P, Zander M, DiezDiaz M, Fonseca S, Glauser G, Lewsey MG, Ecker JR, Solano R, Reymond P. 2013. Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell.* 25:3117-32.
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.* 332:1429-33.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13:249850-4.
- Shearer HL, Cheng YT, Wang L, Liu J, Boyle P, Després C, Zhang Y, Li X, Fobert PR. 2012. Arabidopsis clade I TGA transcription factors regulate plant defenses in an NPR1-independent fashion. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:1459-1468.
- Sinharoy S, Torres-Jerez I, Bandyopadhyay K, Kereszt A, Pisliariu CI, Nakashima J, Benedito VA, Kondorosi E, Udvardi MK. 2013. The C2H2 transcription factor

regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 25:3584-601.

- Smith JM, Salamango DJ, Leslie ME, Collins CA, Heese A. 2014. Sensitivity to Flg22 Is Modulated by Ligand-induced Degradation and de Novo Synthesis of the Endogenous Flagellin Receptor FLAGELLIN SENSING 2. *Plant Physiol*. 164:440-54.
- Song K, Jang M, Kim SY, Lee G, Lee GJ, Kim DH, Lee Y, Cho W, Hwang I. 2012. An A/ENTH domain-containing protein functions as an adaptor for clathrin-coated vesicles on the growing cell plate in *Arabidopsis* root cells. *Plant Physiol*. 159:1013-25.
- Sparkes I, Runions J, Hawes C, Griffing L. 2009. Movement and remodeling of the endoplasmic reticulum in nondividing cells of tobacco leaves. *Plant Cell*. 21:3937-49.
- Sparkes IA, Frigerio L, Tolley N, Hawes C. 2009b. The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. *Biochem J*. 423:145-55.
- Sparkes I, Tolley N, Aller I, Svozil J, Osterrieder A, Botchway S, Mueller C, Frigerio L, Hawes C. 2010. Five *Arabidopsis* reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. *Plant Cell*. 22:1333-43.
- Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG, Howell SH. 2013. BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25:1416-29.
- Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:513-25.

- Surpin M, Raikhel N. 2004. Traffic jams affect plant development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(2):100-9.
- Suwastika IN, Uemura T, Shiina T, Sato MH, Takeyasu K. 2008. SYP71, a plantspecific QcSNARE protein, reveals dual localization to the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell Struct Funct.* 33:185-92.
- Tajima H, Iwata Y, Iwana M, Takayama S, Koizumi N. 2008. Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochem Biophys Res Commun.* 374:242-247.
- Takác T, Pechan T, Richter H, Müller J, Eck C, Böhm N, Obert B, Ren H, Niehaus K, Samaj J. 2011. Proteomics on brefeldin A treated Arabidopsis roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the crosstalk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *J Proteome Res.* 10:488-501.
- Teh, O. K, Moore, I. (2007). An ARFGEFacting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* 448, 493–6.
- Thum KE, Shin MJ, Gutiérrez RA, Mukherjee I, Katari MS, Nero D, Shasha D, Coruzzi GM. 2008. An integrated genetic, genomic and systems approach defines gene networks regulated by the interaction of light and carbon signaling pathways in Arabidopsis. *BMC Syst Biol.* 2:31.
- Tolley N, Sparkes I, Craddock CP, Eastmond PJ, Runions J, Hawes C, Frigerio L. 2010. Transmembrane domain length is responsible for the ability of a plant reticulon to shape endoplasmic reticulum tubules in vivo. *Plant J.* 64:4118.
- Tyrrell M, Campanoni P, Sutter JU, Pratelli R, Paneque M, Sokolovski S, Blatt MR. 2007. Selective targeting of plasma membrane and tonoplast traffic by inhibitory (dominantnegative) SNARE fragments. *Plant J.* 51:1099-1115.

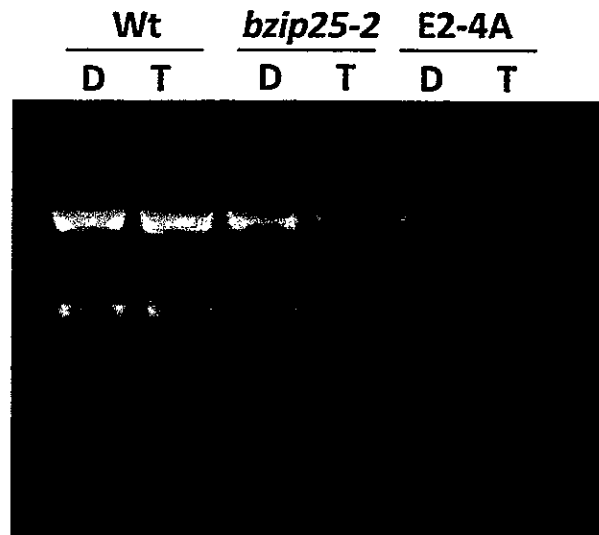
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH. Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the postGolgi network in plant cells. *Cell Struct Funct.* 29:49-65.
- Urade R. 2007. Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. *FEBS.* 274:1152-71.
- Urano D, Phan N, Jones JC, Yang J, Huang J, Grigston J, Taylor JP, Jones AM. 2012. Endocytosis of the seven-transmembrane RGS1 protein activates G protein-coupled signalling in Arabidopsis. *Nat Cell Biol.* 14:1079-88.
- Vermeer JE, van Leeuwen W, Tobeña-Santamaria R, Laxalt AM, Jones DR, Divecha N, Gadella TW Jr, Munnik T. 2006. Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J.* 47:687-700
- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. 2003. Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131:1191-208.
- Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, Krebs M, Langhans M, van den Berg W, van Dongen W, Richter S, Geldner N, Takano J, Jürgens G, de Vries SC, Robinson DG, Schumacher K. 2010. Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the transGolgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell.* 22:1344-57.
- Vitale A, Boston RS. 2008. Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: insights from plants. *Traffic.* 9:1581-8.
- Vitale A, Ceriotti A, Denecke J. 1993. The Role of the Endoplasmic Reticulum in Protein Synthesis, Modification and Intracellular Transport. *J Exp Botany.* 44:1417-44.

- Wang C, Yan X, Chen Q, Jiang N, Fu W, Ma B, Liu J, Li C, Bednarek SY, Pan J. 2013. Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 25:499-516.
- Wang J, Cai Y, Miao Y, Lam SK, Jiang L. 2009. Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *J Exp Bot*. 60:3075-83
- Weltmeier F, Ehlert A, Mayer CS, Dietrich K, Wang X, Schütze K, Alonso R, Harter K, VicenteCarbajosa J, DrögeLaser W. 2006. Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J*. 25:3133-43.
- Weltmeier F, Rahmani F, Ehlert A, Dietrich K, Schütze K, Wang X, Chaban C, Hanson J, Teige M, Harter K, VicenteCarbajosa J, Smeekens S, DrögeLaser W. 2009. Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol*. 69:107-19.
- Wick P, Gansel X, Oulevey C, Page V, Studer I, Dürst M, Sticher L. 2003. The expression of the tSNARE AtSNAP33 is induced by pathogens and mechanical stimulation. *Plant Physiol*. 132:343-51.
- Woollard AA, Moore I. 2008. The functions of Rab GTPases in plant membrane traffic. *Curr Opin Plant Biol*. 11:610-9.
- You S, Yoo SA, Choi S, Kim JY, Park SJ, Ji JD, Kim TH, Kim KJ, Cho CS, Hwang D, Kim WU. 2014. Identification of key regulators for the migration and invasion of rheumatoid synoviocytes through a systems approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:550-5.

- Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. 2006. Agrobacteriummediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc.* 1:641-6.
- Zouhar J, Hicks GR, Raikhel NV. 2004. Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9497-501.

Anexo 1: Imagen representativa de las electroforesis de RNA en gel denaturante obtenidos en esta tesis.

Electroforesis de RNA obtenido del tratamiento de plantas silvestres (Wt), *bzip25-2* y la línea 35S::bZIP25.1-GFP *bzip25/bzip25-2* con Wm 30 μ M por 3 horas. La electroforesis fue realizada según lo descrito en la sección 2.3.3.



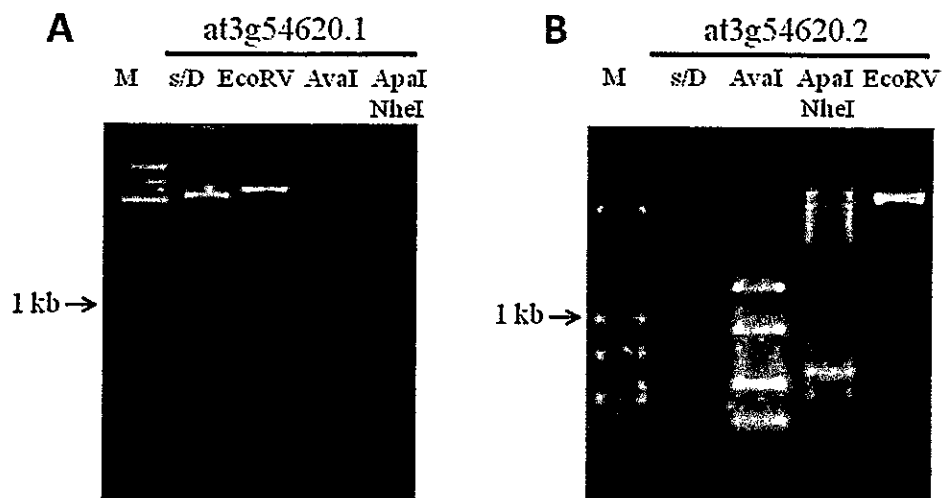
Anexo 2: Información de las líneas mutantes insercionales que fueron adquiridas desde el banco de semillas ABRC.

Se indica el nombre del factor de transcripción seleccionado, el locus asociado, el nombre del germoplasma correspondiente al alelo mutado, el sitio que interrumpe la mutación según lo descrito en la base de datos. Con un signo positivo (+) se marca si es que fue identificada una línea homocigota y la disponibilidad actual de semillas. (*) Líneas disponibles su uso gracias a una colaboración con el Dr. Ariel Orellana (Universidad Andrés Bello) previamente caracterizadas por Liu et al, 2007.

Gen	Locus	Germoplasma	Sitio Inserción	Homocigotas	Semillas
NAC017	AT1G34190	salk_025104C	5'UTR	+	+
		salk_022174C	Exon 2	—	—
		salk_0269373	3'UTR	+	+
NTL9	AT4G35580	salk_102041C	Promotor	+	+
		salk_065051	Exon 3	+	+
bZIP28	AT3G10800	bzip28-1 (*)	5'UTR	No confirmada	+
		bzip28-2 (*)	Exon 1	No confirmada	+
bZIP25	AT3G54620	bzip25-3, salk_102979	Promotor	+	+
		bzip25-2, salk_148423C	Exon 1	+	+
		bzip25-1, salk_119931C	5'UTR	+	+
UNE12	AT4G02590	salk_010825C	Exon 5	—	—
MYC3	AT5G46760	myc3-1, salk_012763C	Exon 1	+	No disponible
		salk_048028C	Promotor	—	—
UNE12-LIKE	AT1G03040	salk_005407C	Intron 2	—	—
		salk_137338C	Intron 5	—	—
		salk_079917	Exon 1	—	—

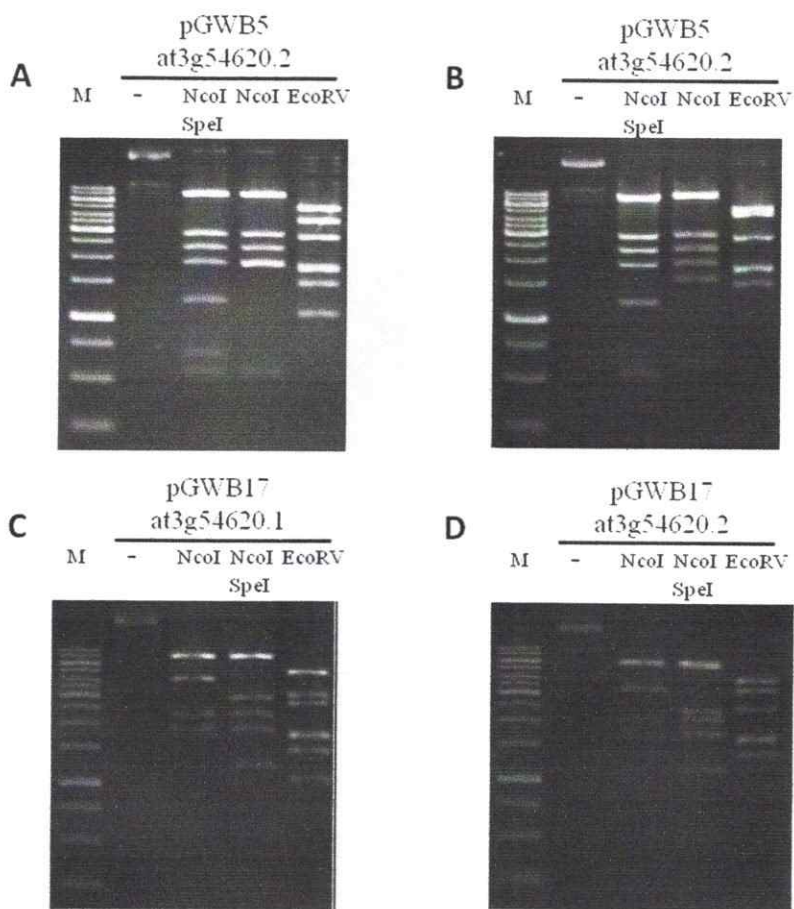
Anexo 3: Análisis de restricción del clonamiento de bZIP25 en el vector pCR8/GW/TOPO/TA.

Se analizó mediante digestión con enzimas de restricción clones provenientes del clonamiento del producto amplificado de AT3G54620.1 y AT3G54620.2 en el vector pCR8/GW/TOPO/TA que fueron previamente analizados por PCR. En **A** se muestra el análisis de restricción del clonamiento de AT3G54620.1 En **B** se muestra el análisis de restricción del clonamiento de AT3G54620.2. Los tamaños esperados de estas digestiones corresponden a las esperadas teóricamente. Electroforesis de agarosa 1.2%. M indica el estándar de peso molecular.

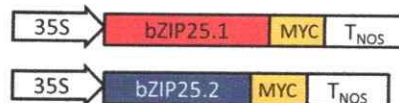
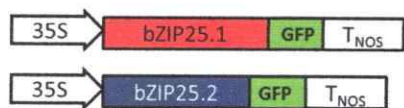


Anexo 4: Análisis de restricción del clonamiento de bZIP25 en vectores binarios.

Se analizó mediante digestión con enzimas de restricción clones provenientes del clonamiento AT3G54620.1 y AT3G54620.2 en los vectores de clonamiento pGWB5 y pGWB17. En A se muestra el análisis de restricción del clonamiento de AT3G54620.1 en el vector pGWB5, en B se muestra el análisis del clonamiento de AT3G54620.2 en el vector pGWB5. El análisis de restricción del clonamiento de AT3G54620.1 y AT3G54620.2 en el vector pGWB17 son presentados en C y D, respectivamente. Los ensayos de restricción fueron realizados usando las enzimas NcoI, NcoI y SpeI, y EcoRV. Los tamaños esperados de los productos de estas digestiones corresponden a los esperados teóricamente Electroforesis de agarosa 1.2%. M indica el estándar de peso molecular. E) Esquemas de las construcciones de sobre-expresión generadas en esta tesis a partir del vector pGWB5: 35S::bZIP25.1-GFP y 35S::bZIP25.2-GFP; y a partir del vector pGWB17: 35S::bZIP25.1-MYC y 35S::bZIP25.2-MYC.



E)



Anexo 5: Red Regulatoria del Tráfico versión 2.0

Los nodos circulares representan a 276 factores de transcripción y los cuadrados a 124 genes de tráfico. El tamaño (pequeño a grande) y el color (verde a rojo) de los nodos representan el grado del nodo (menor a mayor). El grosor (delgado a grueso) y color (verde a rojo) de las líneas representan el índice de *betweenness centrality*. La Red Regulatoria del Tráfico fue dibujada utilizando Cytoscape (©2001-2014 <http://www.cytoscapeconsortium.org>).

