

UCH-FC
Doc-BMCN
U73
c.1



**Universidad de Chile
Facultad de Ciencias**



**EPSILON-ADR y GAMMA-ADRs en la ruta
secretora y su efecto en el desarrollo y
crecimiento de la planta**

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento de los requisitos
para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias

por

Daniela Cecilia Urbina Alvear

Santiago de Chile, 2011

Director de Tesis: Dra. Lee Ann Meisel

Profesor Patrocinante: Dra. Liliana Cardemil

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.

Daniela Cecilia Urbina Alvear

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito parcial para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de Junio de 2011

Director de Tesis:

Dra. Lee Ann Meisel..... 

Profesor Patrocinante de Tesis

Dra. Liliana Cardemil..... 



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Nuñez (Presidente)..... 

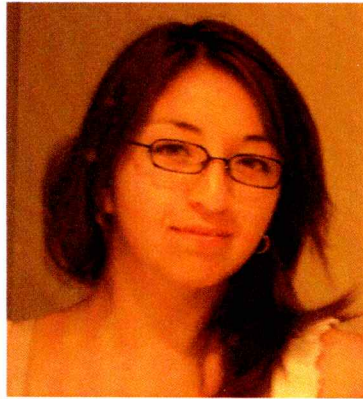
Dra. Ma. Paz Marzolo..... 

Dra. Ximena Sierralta..... 

Dra. Julieta Gonzalez.....



A la mujer que cultivó durante toda su vida la libertad, la honestidad, la perseverancia y el optimismo...con cada respiro...con cada palabra...en cada despertar...Patricia Alvear.



El 31 de Marzo de 1979, nací en el seno de una pareja de profesionales jóvenes. Luego vinieron Carolina y Wilito con entre 3 y 4 años de diferencia. Mi mamá, Patricia Alvear, profesora de estado en inglés y vendedora de lo que tuviera en frente, junto a mi papá, Wilfredo Urbina, pequeño empresario de la locomoción colectiva, sacaron a delante a esta familia, brindándonos, una infancia inolvidable. De niña estudié en las monjas hasta 8° Básico, lo que me formó una idea muy clara y vivencial de la iglesia católica y sus influencias. En 1° Medio, ingresé al Liceo N° 7 de Providencia, donde egresé de 4° Medio en el año 1996. Durante este período de mi vida descubrí mi vocación... de la Astronomía pasé a la Biología Molecular e Ingeniería Genética. Durante este período, también, desarrollé mis máximas aptitudes artísticas y sociales, que me llevaron a participar en el coro del Liceo, donde obtuvimos el 1° lugar en el concurso crecer cantando durante el año 1994. Ese mismo año obtuvimos el tercer lugar regional en Gimnasia Rítmica, representando a mi Liceo y participé en varias competencias comunales de Gimnasia Aeróbica, obteniendo excelentes resultados. El año 1997 ingresé a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, una carrera que según entendía combinaba de una forma perfecta mis intereses y gustos profesionales. Tempranamente en la Universidad, entré a trabajar como pasante en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, que mas tarde se convirtió en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal y que hoy es el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal. El 2000 comencé a trabajar de lleno en unidades de investigación bajo la dirección de la Dra. Lee Meisel, que para ese entonces llevaba a penas 1 año en Chile. El 2003 terminé mis estudios de pregrado obteniendo el título Profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular con Distinción. Ese mismo año tomé la importante decisión de seguir una carrera académica, entrando al Programa de Doctorado en Biología Molecular, Celular y Neurociencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile al año siguiente. Durante este periodo académico he desarrollado mis máximas aptitudes profesionales e intelectuales y hoy me siento orgullosa y plena y, a pesar de que quise tirar todo por la borda en muchos momentos durante estos largos 7 años, hoy sé que llevar a término este periodo de mi vida a sido una de las decisiones mas importantes que he tomado.

Agradecimientos

Quiero partir este escrito agradeciendo a cada una de las personas que han participado directa o indirectamente en la formación de la persona que soy hoy, la hija, hermana, amiga, compañera, colega, maestra, pareja, mujer, profesional y doctora.

Agradezco enormemente la confianza, paciencia, amor e incondicionalidad de mis papás. Mamita, se que estás disfrutando junto a mi la dulzura y felicidad de cerrar este ciclo de mi vida, gracias infinitas por desvelarte conmigo, por tu apoyo, el animo, la alegría y lo mas importante, el ejemplo, que hace de mi la mujer que soy hoy. Papá te agradezco la preocupación, la contención y el amor...sin todo esto no hubiera sido capaz de continuar caminando en la vida después de que mi mamita se fue. Wilito, mi hermano preferido y taolino, mi hermana favorita, les agradezco tanta paciencia, tanto apoyo emocional y a veces económico. Les agradezco la preocupación y la contención, el ánimo y las alegrías. A toda mi bella familia, primas y primos, tías, tíos y abuelos que ya no están pero que siempre me inculcaron la perseverancia y me incentivaron a ser una mujer profesional e independiente. Tantos grandes amigos que he ido conociendo y queriendo durante estos 32 años. No los nombraré pues no quiero olvidar a nadie, pero sepan que su apoyo y contención han sido gravitantes para llegar a estas instancias de mi vida, cerrando un ciclo.

Compañeros de trabajo y amigos, que gracias ha esta tesis he tenido el placer de conocer y de compartir tantos momentos buenos y no tan buenos; agradezco sus consejos, compañía, y sobre todo, por llenar el día a día en el lab de alegrías y locuras.

Finalmente, quiero agradecer a mi tutora, la Doctora Lee Ann Meisel, que ha sido mi madre en la ciencia, de la que he aprendido gran parte de lo que soy hoy científicamente. Quiero agradecer la confianza que depositó en mi y cada una de las oportunidades que me brindó durante mi formación académica y la paciencia que tuvo durante los 10 años que trabajamos juntas.

Por último, agradezco los consejos y las críticas siempre constructivas de cada uno de los integrantes de mi comisión de tesis, Doctor Tulio Núñez, Dra. Ximena Sierralta, Dra. M^a Paz Marzolo, Dra. Julieta González y a mi Profesora Patrocinante, Dra. Liliana Cardemil.

Financiamiento

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias al apoyo de:

- Núcleo Milenio en Biología Celular Vegetal y Núcleo Milenio en Biotecnología y Biología Celular Vegetal (ICM P02-009-F/ICM PCB-P06-065-F, 2004-2010)
- Beca CONICYT de Capital Humano (2007)
- Beca MECESUP de estadía nacional, proyecto UCH 0409 (2005)
- Proyecto AKA/Conicyt CCF01 (2009-2010)
- Universidad de Tuebingen. Alemania (2007)
- Centro de Biotecnología Vegetal. Universidad Andrés Bello (2005-2010)

Índice de Contenidos

Agradecimientos	v
Financiamiento.....	vi
Índice de Contenidos	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xvii
1 Introducción	1
1.1 <i>Ciclo celular y ruta secretora</i>	2
1.2 <i>Formación de vesículas y tráfico en la red post Golgi</i>	5
1.3 <i>Adaptinas y su función biológica en sistemas eucariontes</i>	6
1.4 <i>Adaptinas en plantas</i>	8
1.5 <i>Hipótesis</i>	10
1.6 <i>Objetivo general</i>	10
1.7 <i>Objetivos específicos</i>	10
2 Materiales y métodos.....	11
2.1 <i>Material vegetal y condiciones de cultivo</i>	11
2.1.1 <i>Cultivo de Arabidopsis en condiciones estériles</i>	11
2.1.2 <i>Cultivo de Arabidopsis en hidroponía</i>	12
2.1.3 <i>Transformación de Arabidopsis thaliana a través de inmersión floral</i>	12
2.2 <i>Diseño y obtención de plantas transgénicas RNAi para adaptina GAMMA-ADR de Arabidopsis</i>	13
2.3 <i>Material microbiológico y condiciones de cultivo</i>	17
2.3.1 <i>Preparación de células competentes de E. coli DH5α</i>	18
2.3.2 <i>Transformación de E. coli DH5α</i>	19
2.3.3 <i>Extracción de ADN plasmidial desde E. coli DH5α</i>	19
2.3.4 <i>Preparación de células competentes de Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.3.5 <i>Transformación de Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.4 <i>Clonación de genes de interés en sistema Gateway</i>	21
2.5 <i>Extracción de ARN desde material vegetal</i>	24
2.6 <i>Análisis de expresión: RT-PCR, PCR cuantitativo</i>	25
2.7 <i>Electroforesis de geles de agarosa para análisis de ADN</i>	25
2.8 <i>Anticuerpos policlonales</i>	27
2.8.1 <i>Diseño y Obtención de Anticuerpos policlonales</i>	27
2.8.2 <i>Purificación de anticuerpos policlonales por columnas de afinidad</i>	27
2.8.3 <i>Expresión heteróloga de EPSILON-ADR en bacterias utilizando un sistema inducible por IPTG</i>	28
2.9 <i>Obtención de extractos proteicos y análisis por inmunoblot</i>	29
2.9.1 <i>Obtención de extractos de proteínas totales desde tejido vegetal</i>	29
2.9.2 <i>Obtención de extractos microsomales crudos y fracciones solubles desde tejido vegetal</i>	29
2.9.3 <i>Inmunoblot</i>	30
2.9.4 <i>Cuantificación de proteínas mediante el método BCA</i>	31
2.9.5 <i>Inmunoprecipitación de EPSILON-ADR de Arabidopsis thaliana</i>	32
2.9.6 <i>Tinción con cloruro de plata para geles de poliacrilamida SDS-PAGE</i>	32

2.10	<i>Tratamientos e incubaciones en planta completa y células en suspensión de Arabidopsis thaliana</i>	33
2.10.1	<i>Tratamientos con citoquinina y sacarosa</i>	33
2.10.2	<i>Tratamientos con modificadores de ruta secretora</i>	34
2.10.3	<i>Sincronización de ciclo celular en cultivos de células en suspensión de Arabidopsis</i>	34
2.11	<i>Inmunolocalización en planta completa</i>	35
2.12	<i>Clarificación de tejido para cuantificación de raíces laterales (LR) y primordios (LRP) en Arabidopsis thaliana</i>	36
2.13	<i>Genotipificación de mutantes insercionales</i>	37
2.13.1	<i>Extracción de ADN genómico de hoja de Arabidopsis</i>	37
2.13.2	<i>Genotipificación por PCR</i>	37
2.14	<i>Cuantificación de glucosa total en semillas de Arabidopsis thaliana</i>	38
2.15	<i>Análisis de microscopía confocal, epifluorescente y Nomarski</i>	39
2.16	<i>Análisis estadístico de datos</i>	39
3	Resultados	40
3.1	Capítulo I: EPSILON-ADR en la célula vegetal y su posible papel en desarrollo y división celular	40
3.1.1	<i>El transcrito de EPSILON-ADR se encuentra enriquecido en silicuas y cultivos de células en suspensión</i>	40
3.1.2	<i>El ciclo celular regula la expresión de EPSILON-ADR en plantas</i>	41
3.1.3	<i>EPSILON-ADR es una proteína tejida específica asociada a membranas</i>	46
3.1.3.1	<i>Diseño, obtención y especificidad de anticuerpos policlonales</i>	46
3.1.3.2	<i>EPSILON-ADR es una proteína presente en tejidos con alta división celular, asociada a membranas e insensible a BFA</i>	47
3.1.3.3	<i>EPSILON-ADR es una proteína acumulada principalmente en caliptra lateral, epidermis y corteza de raíces de Arabidopsis thaliana</i>	51
3.1.3.4	<i>EPSILON-ADR está asociada a organelos o cuerpos intracelulares no caracterizados</i>	52
3.1.3.5	<i>¿EPSILON-ADR forma parte de un complejo proteico en plantas?</i> ..	54
3.1.4	<i>Genética reversa para el estudio de la función Biológica de EPSILON-ADR en Arabidopsis thaliana</i>	55
3.1.4.1	<i>Caracterización genotípica y fenotípica de una mutante Knock-out en EPSILON-ADR</i>	55
3.1.5	<i>EPSILON-ADR está conservado entre plantas y vertebrados en secuencias y posible función</i>	61
3.2	Capítulo II: GAMMA-ADRs y su rol biológico en plantas	65
3.2.1	<i>Plantas RNAi contra GAMMA-ADRs de Arabidopsis thaliana</i>	65
3.2.2	<i>GAMMA-ADRs participan en el desarrollo y crecimiento de órganos en Arabidopsis thaliana</i>	65
3.2.3	<i>GAMMA-ADRs participarían en el tráfico de la proteína KNOLLE en raíces de Arabidopsis thaliana</i>	70
3.2.4	<i>Gammal-ADR se distribuye punteadamente en células de la raíz de Arabidopsis</i>	71
4	Discusión	74
4.1	<i>La función biológica de EPSILON-ADR está asociada al ciclo celular</i>	74
4.2	<i>Niveles de transcrito y proteína de EPSILON-ADR, sugieren mecanismos moleculares de regulación tejido específico</i>	77
4.3	<i>La distribución de EPSILON-ADR sugiere un compartimiento subcelular no definido en tejidos específicos de la raíz</i>	78
4.4	<i>¿EPSILON-ADR es parte de un complejo proteico en plantas?</i>	81

4.5	<i>EPSILON-ADR y su participación en desarrollo embrionario y crecimiento de raíces</i>	82
4.6	<i>GAMMA-ADR participaría en el desarrollo y crecimiento de órganos en plantas</i>	86
4.7	<i>El tráfico de KNOLLE hacia la degradación en vacuola podría estar mediado directa o indirectamente por GAMMA-ADRs en Arabidopsis thaliana</i>	88
4.8	<i>GAMMAI-ADR está asociada a estructuras intracelulares en células de la raíz de Arabidopsis thaliana</i>	92
5	Conclusiones	94
6	Referencias	97

Índice de figuras

<i>Figura 1. Estrategia para construir plantas transgénicas expresando ARN interferentes que permitan silenciar los tres genes putativos que codifican para GAMMA-ADRs en Arabidopsis thaliana.</i>	15
<i>Figura 2. Esquema de las proteínas en estudio y la ubicación del péptido seleccionado para obtención de anticuerpos policlonales.</i>	28
<i>Figura 3. EPSILON-ADR se expresa mayoritariamente en cultivos de células en suspensión y silicuas.</i>	41
<i>Figura 4. EPSILON-ADR es inducido por citoquinina y sacarosa.</i>	43
<i>Figura 5 (Página siguiente). Expresión de EPSILON-ADR es regulada durante el ciclo celular.</i>	44
<i>Figura 6. El anticuerpo policlonal contra anti-EPSILON-ADR reconoce a la proteína expresada en un sistema heterólogo</i>	47
<i>Figura 7. La proteína EPSILON-ADR tiene una distribución tejido específica, está asociada a membranas y su distribución subcelular es insensible a BFA.</i>	48
<i>Figura 8. EPSILON-ADR se acumula durante la división celular en raíces de Arabidopsis thaliana</i>	49
<i>Figura 9. Anticuerpo contra EPSILON-ADR genera un patrón punteado en células del meristema de la raíz, que no se ve alterado en presencia de BFA</i>	50
<i>Figura 10. EPSILON-ADR se distribuye preferencialmente en células de la caliptra lateral, epidermis y corteza en raíces de Arabidopsis thaliana.</i>	51
<i>Figura 11. EPSILON-ADR reside en organelos de identidad no caracterizada.</i>	53
<i>Figura 12. Ensayo de inmuno precipitación utilizando anticuerpo contra EPSILON-ADR muestra una banda de alto peso molecular.</i>	55
<i>Figura 13. (Página siguiente). Mutante eps1.3 homocigota es nula para la presencia de transcrito y proteína, presenta defectos en el crecimiento de raíz primaria, fenotipo que es exacerbado en ausencia de sacarosa.</i>	56
<i>Figura 14. Mutante insercional eps1.3^{+/-} presenta defectos en silicuas y embriones</i>	58
<i>Figura 15. eps1.3 homocigota, presenta reducción en el tamaño de órganos aéreos</i>	60
<i>Figura 16. Contenido total de glucosa en semillas de Arabidopsis thaliana Col-0 y eps1.3 homocigotas, sugiere defectos en almacenamiento de carbohidratos en semillas.</i>	61
<i>Figura 17 EPSILON-ADR es una proteína conservada sólo entre vertebrados y plantas.</i>	63
<i>Figura 18. Análisis de expresión de mutantes en GAMMA-ADR.</i>	67

<i>Figura 19. Disminución de la expresión de GAMMA-ADR genera disminución en el tamaño de órganos en la planta.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 20. Disminución y/o ausencia de GAMMA-ADR provoca aumento en el número de raíces laterales en plantas.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 21. Disminución o ausencia de GAMMA-ADRs en plantas genera posibles defectos en el tráfico hacia la vacuola.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 22. GAMMAI-ADR se distribuye punteada y homogéneamente en células de la raíz.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 23. Esquema de los posibles mecanismos moleculares y fisiológicos en los que EPSILON-ADR participaría en plantas.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 24. Esquema que representa las posibles rutas donde GAMMA-ADRs participarían en el tráfico de KNOLLE.....</i>	<i>91</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Partidores y protocolos usados para realizar análisis genotípicos de las mutantes caracterizadas en este estudio.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2. Partidores para amplificar CDS de los genes en estudio.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 3. Partidores utilizados en ensayos de PCR cuantitativo en este estudio.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 4. Anticuerpos usados en este estudio.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 5. Mutantes insercionales caracterizadas en este estudio.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 6. Promotores de ortólogos de EPSILON-ADR en vertebrados y plantas presentan elementos CIS que responden a división celular.....</i>	<i>64</i>

Lista de abreviaturas

ADR	ADaptin Related
ALEU	Aleurona
APs	Complejos Adaptadores
BCA	Bicinchoninic acid
BFA	Brefeldina A
BSA	Suero de Albumina de Bovino
CDS	Secuencia de cADN
D.O	densidad óptica
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhidrato
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNAsa	Nucleasa de ADN
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EPSILON-ADR	Epsilon ADaptin Related
ER-GFP	retículo endoplasmático marcado con proteína fluorescente verde
EtBr	bromuro de etidio
GAMMA-ADR	Gamma ADaptin Related
GAMMAI-ADR	Gamma I ADaptin Related
GAMMAIII-ADR	Gamma III ADaptin Related
GEF	Intercambiador de GTP
GFP	proteína fluorescente verde
h	horas
IGEPL	NP40, detergente no iónico
KAc	acetato de potasio
KDa	Kilo Dalton
KN	KNOLLE
LB	Luria Broth
MES	2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico
min	minutos
MS	mezcla de sales Murashige y Skoog
MSA	Mitotic Site Activation
MTSB	Buffer estabilizador de microtúbulos
MVB	Multi Vesicular Bodies

n	número de eventos
pb	pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	piperazina-N,N'bis (2-ácido etanosulfónico)
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride, inhibidor de proteasas
PVC	Pre Vacuolar Compartment
PVDF	Polyvinylidene Fluoride, membrana para transferir proteínas
qPCR	PCR cuantitativo
RNAi	ARN interferencia
RNAasa	Nucleasa de ARN
s	segundos
SDS	sodio dodecil sulfato
SNX1	Sortin Nexin 1
STM	Buffer Sacarosa, Tris y Magnesio
TAE	Buffer en base a ácido acético y EDTA para correr electroforesis de ADN
TB	buffer para preparación de células competentes por el método Inoue
TBS	Buffer Tris Salino
T-DNA	ADN que se inserta en plantas mediante infección con Agrobacterium
TENS	buffer de extracción de ADN plasmidial. Tris, EDTA, hidróxido de sodio y sodio dodecil sulfóxido
TGN	Trans Golgi Network
WT	Tipo Silvestre

Resumen

En plantas al igual que en animales, el desarrollo embrionario, la división celular, el desarrollo y el crecimiento de órganos y la polaridad completa del individuo son determinadas por el tráfico vesicular subcelular y la identidad de las membranas plasmáticas. Dentro de las proteínas que juegan un rol central en la formación de vesículas y del destino de las proteínas que viajan dentro de las vesículas están las adaptinas. En *Arabidopsis thaliana* existen genes para cada una de las adaptinas descritas en animales, sin embargo no se han caracterizado funcionalmente ni se ha determinado si forman complejos similares a los descritos en animales. Dado que la ruta secretora en plantas funciona gracias al tráfico de vesículas al igual que en animales, las adaptinas deben cumplir funciones similares en este tipo celular. Por ello nos hemos planteado estudiar su función celular y fisiológica en plantas.

Seleccionamos dos proteínas tipo adaptinas codificadas en el genoma de *Arabidopsis*: GAMMA-ADR y EPSILON-ADR adaptina. Diseñamos y caracterizamos anticuerpos policlonales contra estas proteínas, con el objetivo de estudiar y caracterizar su ubicación y distribución subcelular y además estudiamos mediante genética reversa su función biológica en plantas.

Con nuestras herramientas moleculares y genéticas hemos obtenido resultados que sugieren que EPSILON-ADR es una proteína soluble asociada a membranas, ubicada en vesículas de identidad no determinada.

A su vez, hemos determinado que la distribución celular de esta adaptina es insensible a BFA. A nivel de transcrito y proteína, EPSILON-ADR es acumulada durante división celular. A la vez, la putativa secuencia promotora del gen de *EPSILON-ADR* posee elementos en CIS que responden específicamente a división celular. Finalmente, la caracterización de una mutante *knock-out* para *EPSILON-ADR*, nos ha permitido estudiar la función fisiológica y celular en la que esta proteína interviene. Así, hemos caracterizado fenotipos que sugieren que EPSILON-ADR sería necesaria en el desarrollo de la planta completa, modulando el crecimiento de ciertos órganos como hojas y silicuas.

Existen en *Arabidopsis* tres locus que codifican para *GAMMA-ADRs*. Estos genes se expresan homogéneamente en toda la planta. Mutantes *knock-down* en los tres genes muestran fenotipos asociados al aumento en el desarrollo de raíces laterales, así como también disminución en el tamaño global de la planta (hojas, raíces primarias, tallos). Para determinar la distribución subcelular de *GAMMAI-ADR*, construimos plantas transgénicas que sobreexpresan *GAMMAI-ADR* fusionada a GFP, lo que nos mostró que esta proteína se distribuye punteadamente por el citoplasma. La distribución de esta proteína es insensible a BFA al igual que EPSILON-ADR. A nivel celular las mutantes *knock-down* (RNAi) presentan aumento de la acumulación de la proteína KNOLLE post división celular, sugiriendo que *GAMMA-ADRs* participan en el tráfico desde la placa celular hacia la vacuola. A su vez, resultados obtenidos con la mutante nula para *GAMMAIII-ADR*

muestran que KNOLLE se acumula mas en estas mutantes respecto de la planta silvestre, apoyando los resultados obtenidos con la mutante *knock-down*.

Todos estos antecedentes nos han llevado a concluir que las Adaptinas cumplirían roles durante el desarrollo de la planta, en el funcionamiento de la ruta secretora y en la destinación de proteínas.

Abstract

During embryonic development of plants and animals, cell division, growth - development of organs and the global polarity of the individual are determined by subcellular vesicular trafficking and the composition of the plasma membrane. Adaptins are proteins that play a central role in vesicle formation and sorting of proteins loaded within these vesicles. The *Arabidopsis thaliana* genome contains genes that encode for each type of Adaptins described in animals. However, they have not been characterized functionally, nor has it been determined whether or not they form complexes similar to those described in animals.

We have selected two Adaptin-like proteins encoded in Arabidopsis genome: GAMMA-ADR and EPSILON-ADR. We designed and characterized polyclonal antibodies against these proteins, with the aim to study and characterize their subcellular location and distribution. Finally, we studied their biological function in plants using a reverse genetics approach.

Using molecular and genetic tools, we have obtained results suggesting that EPSILON-ADR is a soluble, membrane associated protein, located in vesicles of unknown identity. Additionally, we determined that the cellular distribution of this adaptin is insensitive to BFA. At the transcript and protein levels, EPSILON-ADR is highly accumulated during cell division. The putative promoter sequence of the *EPSILON-ADR* gene contains CIS elements described to respond specifically to cell division. Finally, a knock-out mutant

in *EPSILON-ADR* has allowed us to study the physiological and cellular functions in which this protein participates. The phenotypes associated with this knock/out mutant, suggests that *EPSILON-ADR* is necessary for normal plant development, regulating the growth of organs such as siliques and root. There are three Arabidopsis loci encoding *GAMMA-ADRs*. These genes are expressed throughout the plant. Knock-down mutants in the three genes show phenotypes associated with increased development of lateral roots, as well as a decrease in the overall size of the plant (leaves, primary roots and stems). To determine the subcellular distribution of *GAMMAI-ADR*, we constructed transgenic plants that overexpress *GAMMAI-ADR* fused to GFP. Analyses of these plants, demonstrate us that *GAMMAI-ADR* is distributed throughout the cytoplasm in a punctuate pattern. The distribution of this protein is insensitive to BFA, similar to what was seen with *EPSILON-ADR*. At the cellular level, knock-down mutants (RNAi) show increased accumulation of the *KNOLLE* protein in cells post cell division, suggesting that *GAMMA-ADRs* are involved in trafficking from the cell plate into the vacuole. Null *GAMMAIII-ADR* mutants have high accumulation of *KNOLLE*, supporting the results obtained with the knock-down mutants. Altogether, these findings have led us to conclude that *Adaptins* should play role during plant development, secretory route and protein sorting.

1 Introducción

Durante el desarrollo embrionario tanto de plantas como animales, la división celular, el crecimiento, el desarrollo de órganos y la polaridad completa del individuo son determinadas por el tráfico vesicular y las características de las membranas plasmáticas (Jaillais y cols. 2007). La ruta secretora y endocítica son las responsables de generar la identidad de las membranas. Dichas características de las membranas son relevantes respecto a las células vecinas y respecto de la función de la célula (células secretoras o receptoras de señales, epitelios, lumen de órganos, etc.)

En plantas, durante el desarrollo, la hormona Auxina es direccionada por transportadores tipo PIN, los cuales generan flujos direccionados de la hormona permitiendo división celular, diferenciación celular y crecimiento de órganos (Dello Ioio y cols. 2008). La ubicación de los transportadores de Auxina define identidades en la membrana plasmática de la célula vegetal. Estos transportadores están ubicados de forma polarizada en la membrana plasmática de manera dependiente de la actividad de proteínas tipo ARF-GEF (Kleine-Vehn y cols. 2008). GNOM, es un ARF-GEF de plantas necesario para la destinación correcta de algunos de los transportadores de auxina tipo PIN (Geldner y cols. 2003), el cual es inactivado por BFA (BreFeldina A), una droga de origen fúngico que se une específicamente al dominio SEC 7 de los ARF-GEF (Zeeh y cols. 2006), inactivándolos. La

ausencia de GNOM en plantas genera aberraciones a nivel embrionario, causando letalidad. Además se ha determinado que GNOM es necesario para el desarrollo de raíces lateral en plantas (Geldner y cols. 2004; Steinmann y cols. 1999), demostrando la importancia de la ruta secretora y endocítica en el desarrollo completo de la planta.

1.1 Ciclo celular y ruta secretora

La maquinaria de ruta secretora es determinante en procesos fisiológicos y del desarrollo. En diversos sistemas eucariontes, el sistema de endomembranas y tráfico vesicular se ha caracterizado molecularmente en detalle, sin embargo su función biológica o los procesos biológicos asociados a esta no han sido cabalmente estudiados.

Particularmente, defectos en la maquinaria de la ruta secretora de plantas afectan el desarrollo radicular y el desarrollo del embrión (Lauber y cols. 1997; Vroemen y cols. 1996). Asimismo, afecta la respuesta a estímulos abióticos como fototropismo y gravitropismo (Hala y cols. 2010; Rahman y cols. 2010; Santelia y cols. 2008). El correcto destino de proteínas tipo PIN, transportadores de salida de Auxina, es determinante en procesos celulares como división celular, comunicación de célula-célula y percepción de estímulos bióticos y abióticos. Diversos estudios en plantas describen la maquinaria molecular de la ruta secretora que participan durante la división

celular. Por lo general, este tipo de proteínas son esenciales para el crecimiento vegetal y el desarrollo (Geldner y cols. 2003; Lukowitz y cols. 1996). Por lo tanto, la división celular en los sistemas vegetales es un proceso regulado, que implica la síntesis de novo de proteínas, tráfico vesicular activo para la formación de placa celular y endocitosis de reciclaje de membranas (Dhonukshe y cols. 2006; Reichardt y cols. 2007).

La progresión del ciclo celular es finamente regulada y es esencial para determinar el tiempo de vida y la diferenciación de células individuales. Las etapas del ciclo celular son comunes en todo tipo de sistemas celulares: S, etapa en la cual el ADN se replica; G2, donde las células preparan su metabolismo para entrar en división celular; M, división celular y citocinesis. La maquinaria específica para la división celular se ha caracterizado en todos los sistemas eucariontes desde mamíferos a levaduras. Los filamentos de actina son necesarios para el movimiento de moléculas al plano de división celular y los microtúbulos son necesarios para mover los cromosomas durante la mitosis (Cao y cols. 2010; Schmit y Lambert 1987; Wadsworth 1993).

En plantas, el sistema de tráfico de varias proteínas ha sido caracterizado en el ciclo celular, específicamente durante la división celular. Las proteínas como quinesinas, syntaxinas, ARF-GEF y otras moléculas son necesarias para iniciar, desarrollar y terminar este proceso (Fendrych y cols. 2010; Haga y cols. 2007; Kang y cols. 2003; Kang y cols. 2001; Muller y cols. 2010; Park y cols. 2008; Sollner y cols. 2002; Strompen y cols. 2002; Waizenegger y

cols. 2000; Wang y cols. 2008). Durante la división celular se produce síntesis de novo de proteínas que participan en este proceso (Reichardt y cols. 2007). La endocitosis es un proceso activo durante la división celular, ya que se requiere reciclaje de membranas para dar origen a dos células hijas (Dhonukshe y cols. 2006).

Durante la división celular e inmediatamente antes de este proceso, la identidad de las membranas es relevante para el flujo de auxina entre las células, necesario para el crecimiento de las células hijas después de la división celular (Boutte y cols. 2006; Men y cols. 2008). Por esta razón, durante este proceso la ruta secretora es activa y finamente regulada. Jürgens y colaboradores (Jurgens 2005) han reportado varios componentes de la ruta secretora que participan específicamente en la división celular durante la citocinesis. KNOLLE es una syntaxina esencial para la formación de la placa celular (Lukowitz y cols. 1996). Otro componente de la ruta secretora que participa directamente en la división celular es GNOM, una proteína ARF-GEF que participa en el reciclaje de proteínas desde la membrana plasmática (Steinmann y cols. 1999). Quinesinas como la proteína HINKEL, ayudan a la formación del fragmoplasma y al movimiento de microtúbulos (Strompen y cols. 2002). Por último, NACK1, un factor de depolimerización de microtúbulos, se acumula durante anafase y telofase (Tanaka y cols. 2004). Sin embargo, la maquinaria de formación de vesículas y selección de cargos durante la división celular en plantas y animales está aún en estudio

1.2 Formación de vesículas y tráfico en la red post Golgi

El mecanismo molecular asociado con la formación de vesículas y tráfico intracelular es conservado en los sistemas eucariontes. La formación de vesículas entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi está asociado a las proteínas COP y ARF (Eugster y cols. 2000). Entre el aparato de Golgi, la membrana plasmática y otros organelos de la red post-Golgi, el transporte vesicular se vincula al complejo clatrina, que a su vez se ensambla con proteínas adaptadoras (APs) asociadas a la membrana (Hirst y Robinson 1998). Se han descrito 4 complejos adaptadores caracterizados en eucariontes: AP-1, AP-2, AP-3 y AP-4. Los 4 complejos adaptadores están compuestos por 4 proteínas solubles, adaptinas. La principal función molecular de estas proteínas, es iniciar la formación de las vesículas y seleccionar las proteínas que viajarán en dichas vesículas. De este modo, las adaptinas determinan el destino de las vesículas y su contenido en la red post-Golgi de la ruta secretora y durante endocitosis (Robinson y Bonifacino 2001). Estas proteínas acomplejadas activan y se unen a las membranas de los organelos blanco de manera GTP dependiente (Boehm y Bonifacino 2001; Boehm y Bonifacino 2002). Este proceso es regulado por proteínas tipo ARF-GEF, que promueven la salida de GDP unido a una GTPasa pequeña (ARF) y la entrada de GTP. Los ARF ubicados en las membranas de los organelos se activan al unir GTP, exponiendo sitios de interacción

proteína-proteína. Así reclutan a las adaptinas, que permitirán la formación de una vesícula cubierta por clatrina con cargo seleccionado.

Estudios en levaduras y células animales han demostrado que AP-2, formado por α , β_2 , μ_2 y σ_2 se asocia a clatrina y actina, y participan en la ruta endocítica de varios receptores para factores de crecimiento y vías de señalización (Laporte y cols. 1999; Sorkin y Carpenter 1993; Willingham y cols. 1980). En la ruta secretora se han caracterizado 3 complejos distintos. AP-1, formado por γ_1 , β_1 , μ_1 y σ_1 , participa en el tráfico de Golgi a la membrana plasmática, endosomas y lisosomas (Boehm y Bonifacino 2002). AP-3, formado por δ , β_3 , μ_3 y σ_3 , participa en el tráfico hacia lisosomas y se ha asociado al tráfico de neurotransmisores en las células neuronales (Boehm y Bonifacino 2002), así como a la secreción en granulocitos (Dell'Angelica 2009). Por otra parte, el complejo AP-4, formado por ϵ , β_4 , μ_4 , y σ_4 , se ha caracterizado sólo en mamíferos. El 2002, el grupo de Hunziker (Simmen y cols. 2002) determinó que este complejo cumple un papel en el tráfico a la membrana plasmática en los sistemas polarizado, como las células epiteliales.

1.3 Adaptinas y su función biológica en sistemas eucariontes

Estudios realizados en modelos animales muestran un análisis detallado de la función molecular de las adaptinas, sin embargo existen pocos reportes acerca de la función biológica de dichas proteínas. Por ejemplo, el complejo

AP-1 en mamíferos, se ha asociado al reciclaje de vesículas sinápticas. Mutaciones en algunos de los componentes de este complejo provoca pérdida de la capacidad motora y reducción de la memoria a largo plazo en ratones (Glyvuk y cols. 2010).

AP-2, en *C. elegans*, ha sido asociado al reciclaje de vesículas sinápticas (Gu y cols. 2008). Por otra parte, este complejo está asociado directamente con la división celular en el sistema sensorial de *D. melanogaster* durante el desarrollo (Berdnik y cols. 2002)

El complejo AP-3 se ha asociado a la secreción y reciclaje de neurotransmisores en células neuronales (Kantheti y cols. 1998). AP-3 en *C. elegans*, juega un papel durante el desarrollo. Además, se ha reportado que AP-3 participaría en la replicación del VIH SIDA (Garcia y cols. 2008). Asimismo, tanto en ratones como en humanos este complejo participa en la pigmentación, y se ha reportado que está altamente expresado en tipos celulares como melanocitos y granulocitos (Dell'Angelica y cols. 1999; Lloyd y cols. 1998). En *D. melanogaster*, se ha reportado que AP-3 es responsable de la pigmentación de ojos (Mullins y cols. 2000).

AP-4 sólo se ha descrito en mamíferos y Arabidopsis. En mamíferos, AP-4 se ha relacionado con el transporte de precursor de β -amiloides en la ruta secretora (Burgos y cols. 2010) Por otro lado, en el sistema nervioso central (SNC), AP-4 se asoció con el transporte de receptor de glutamato, ambos resultados sugieren un papel de la AP-4 en el sistema neuronal. Estos

antecedentes se correlacionan con una alta expresión de la AP-4 en el SNC (Yap y cols. 2003). Por último, en neuronas, AP-4 se ha asociado a la autofagia (Matsuda y Yuzaki 2008), sugiriendo un rol en muerte celular.

1.4 Adaptinas en plantas

En plantas se pueden encontrar genes relacionados con las proteínas de los cuatro complejos adaptadores (Boehm y Bonifacino 2001; Boehm y Bonifacino 2002). Adaptinas γ de AP-1 y δ de AP-3, se han asociado con el tráfico desde Golgi a la vacuola (Lee y cols. 2007; Song y cols. 2006).

Qiao y colaboradores (2010), informó la función biológica de la AP-1, en arroz, asociando dicho complejo con procesos como senescencia y respuesta hipersensible (Qiao y cols. 2010). Asimismo, demostraron que la proteína AP1M1 se asocia a Golgi y que el gen que codifica para esta proteína, complementa una levadura mutante en ese gen, lo que sugiere una conservación funcional entre *mu1* entre plantas y levaduras. AP-2 específicamente, α y μA han sido asociados a la ruta endocítica (Barth y Holstein 2004). AP-3 de *Arabidopsis thaliana* se ha caracterizado molecular y biológicamente. Feraru y cols. (2010) han asociado a la proteína β -Ap3 con la biogénesis de la vacuola lífica y la función celular de este organelo. Se demostró que esta proteína es necesaria para la maduración de la vacuola lífica. Asimismo, la transición de vacuola lífica a vacuola de almacenamiento

también es un proceso regulado por el complejo AP-3 en plantas (Feraru y cols. 2010). AP-4 no se ha sido estudiado ni caracterizado en plantas.

Dado que la ruta secretora en plantas funciona sobre la base de vesículas al igual que en animales, las adaptinas deben cumplir funciones similares en este tipo celular. Por ello nos hemos planteado estudiar su función celular y fisiológica en plantas.

Seleccionamos por homología de secuencias dos proteínas tipo adaptinas codificadas en el genoma de Arabidopsis: GAMMA-ADRs (GAMMA-ADaptin Related) y EPSILON-ADR (EPSILON-ADaptin Related). Diseñamos y caracterizamos anticuerpos policlonales contra EPSILON-ADR, con el objetivo de estudiar y caracterizar su ubicación y distribución subcelular. Paralelamente, generamos plantas transgénicas de GAMMAI-ADR fusionada a GFP, para el mismo objetivo.

Para acercarnos a entender las funciones fisiológicas y celulares de Adaptinas en plantas caracterizamos mutantes insercionales nulas y *Knock-down* para cada adaptina en estudio y construimos plantas transgénicas que nos permitieron disminuir la expresión de los genes de interés mediante ARN de interferencia.

1.5 Hipótesis

Mediante su participación en la ruta secretora, las proteínas tipo adaptinas de *Arabidopsis thaliana* son necesarias para el funcionamiento celular y fisiológico de la planta

1.6 Objetivo general

Determinar el rol de proteínas tipo adaptinas en la ruta secretora y durante el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

1.7 Objetivos específicos

1. Determinar la distribución celular de GAMMA-ADRS y EPSILON-ADR en plantas
2. Obtener y caracterizar plantas mutantes con pérdida de función y/o Knock-down para GAMMA y EPSILON-ADR.
3. Analizar fenotípicamente las mutantes y caracterizar la funciones celulares y fisiológicas de los genes en estudio

2 Materiales y métodos

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para todos los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, ecotipo Columbia (CS6000) obtenidos del Ohio State Arabidopsis Seed Stock Center. Las mutantes analizadas (Ohio State Arabidopsis Seed Stock Center) y las plantas transgénicas construidas tienen el mismo background y se resumen en la Tabla 1.

2.1.1 Cultivo de *Arabidopsis* en condiciones estériles

Las semillas fueron esterilizadas en tubos de 1,5 ml con 1 ml de etanol 70 %, las que fueron agitadas manualmente por unos segundos, luego el etanol se descartó y se agregó 1 ml de cloro comercial, se agitó por unos pocos segundos luego de los cuales se descartó y finalmente las semillas fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Por último, las semillas fueron suspendidas en agua estéril y sembradas en placas con medio ½X MS pH 5,7 (½X Murashige & Skoog mezcla de sales, amortiguador MES 0.05%), agar 0,8%, suplementadas con sacarosa 1%. Las plantas transgénicas fueron sembradas en medio ½X MS agar suplementadas con sacarosa 1% y kanamicina o higromicina 50 µg/ml, dependiendo del tipo de vector utilizado para la transgenia.

Las semillas sembradas en placas fueron estratificadas por 48 h en oscuridad a 4° C y posteriormente fueron cultivadas en una cámara de cultivo

de tejido estéril con condiciones de luz, temperatura y fotoperíodo controlados (23° C, 16 h luz/8 h oscuridad)

2.1.2 Cultivo de *Arabidopsis* en hidroponía

Semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas en medio hidropónico (KNO₃ 125 mM, Ca (NO₃)₂ 150 mM, MgSO₄ 75 mM, KH₂PO₄ 50 mM, KCl 5 mM, H₃BO₃ 5 mM, MnSO₄ 1 mM, ZnSO₄ 200 µM, CuSO₄ 150 µM, Na₂O₃Si 150 µM, y hierro acomplejado con DTPA 72 mM), luego de lo cual fueron puestas en cámara de crecimiento con condiciones controladas de luz, temperatura y fotoperíodo (23° C, 16 h luz/8 h oscuridad).

2.1.3 Transformación de *Arabidopsis thaliana* a través de inmersión floral

Este protocolo fue descrito por Clough y cols. (Clough y Bent 1998), para el cual se utilizaron plantas de *Arabidopsis* silvestres ecotipo *Columbia* crecidas en hidroponía, de aproximadamente 6 semanas con inflorescencias nuevas (aproximadamente 3 inflorescencias de 10 cm de largo con flores a punto de abrir), a las cuales se les cortaron las silicuas ya producidas. Para la transformación se prepararon cultivos de *Agrobacterium* (cepa GV3101), transformados con los vectores de interés, los cuales se iniciaron a partir de un pre-inóculo crecido a 25° C por 2 días en un agitador termorregulado de agua con agitación constante y buena aireación, en medio LB suplementado con los antibióticos gentamicina 100 µg/ml, rifampicina 10 µg/ml y el

antibiótico de selección para el vector transformante. 100 µl de este pre-inóculo se utilizaron para inocular 250 ml de LB suplementado con los mismos antibióticos para generar el cultivo óptimo para la transformación, el cual se creció a una temperatura de 25° C con agitación constante y alta aireación hasta alcanzar una D.O._{600nm} de entre 0,6 a 0,8. El cultivo, fue centrifugado a 6000xg por 10 min a 4° C para precipitar las células las cuales fueron resuspendidas en 250 ml de solución de transformación (Silwett L-77 0,05 % v/v; sacarosa 3% p/v).

Las inflorescencias de las plantas (aproximadamente cuatro plantas por vector), fueron sumergidas (invertidas) en la solución de transformación con *Agrobacterium* durante 15 s y posteriormente fueron puestas en oscuridad en posición horizontal a temperatura ambiente por 16 h, cubiertas con plástico. Finalmente las plantas fueron transferidas a una cámara de crecimiento con condiciones constantes de luz, temperatura (23° C) y fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, a la espera de la recolección de semillas.

2.2 Diseño y obtención de plantas transgénicas RNAi para adaptina GAMMA-ADR de Arabidopsis

Un segmento de 400 pb común para los tres loci de GAMMA-ADRs presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Figura 1A), fue clonado en pENTR-SD/TOPO clonig vector (INVITROGEN. Figura 1B). Mediante recombinación usando clonasa LR (INVITROGEN), se subclonó este segmento en pHELLSGATE8, vector compatible con el sistema Gateway,

que permite realizar la estrategia de ARN de interferencia en plantas (Figura 1C). El nuevo vector, fue transformado en *Agrobacterium* y posteriormente mediante inmersión floral, se obtuvieron plantas transgénicas (T0), cuyas semillas (T1) fueron sembradas en medio suplementado con Kanamicina para su selección.

Tabla 1. Partidores y protocolos usados para realizar análisis genotípicos de las mutantes caracterizadas en este estudio.

	Primers alelo silvestre	Primers alelo mutante	Temperatura de aniling
<i>Gammal</i> (At1g23900)	SALK_109928C	JNV14F LBb1.3	50°C
	SALK032500	32500F LBb1.3	50°C
	SALK032502	32500.F LBb1.3	50°C
	SALK_028208	JNV2R LBb1.3	50°C
	SALK_043364	LM332 LM333	50°C
<i>Gammall</i> (ATTG60070)	SAL_082956	JNV10F LBb1.3	50°C
	SALK_075177	JNV11F LBb1.3	50°C
	SALK_126133	JNV11F LBb1.3	50°C
	SALK_125109	JNV4F LBb1.3	50°C
	SALK_136213	JNV4F LBb1.3	50°C
<i>EPSILON</i> (ATTG31730)	CS857164	JNV7R LBb1.3	52°C

2.3 Material microbiológico y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizaron las bacterias *E. coli* DH5 α , TOP10, BL21 (DE3) pLys (Studier y Moffatt 1986) y *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 (Xiao y cols. 2010). Cultivos líquidos de DH5 α , TOP10, BL21 (DE3) pLys, fueron crecidos a 37° C con agitación constante, en medio LB (pectona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% en agua destilada) por la noche. Los stocks de glicerol, minipreps y midipreps fueron preparados a partir de estos cultivos de noche. Los cultivos líquidos para llevar a cabo el protocolo de células competentes son detallados en 2.3.1. Cultivos sólidos de *E.coli* fueron crecidos en una estufa o cámara de cultivo a 37° C durante la noche en medio LB agar (bactoagar 1,5%). Los antibióticos usados como medio de selección para bacterias transformadas con los vectores de interés fueron kanamicina 100 μ g/ml, ampicilina 200 μ g/ml y espectinomicina 50 μ g/ml. Los antibióticos fueron usados en medios líquidos y sólidos.

Cultivos líquidos de *Agrobacterium* fueron crecidos entre 25 y 28° C [sobre 30° C *Agrobacterium* pierde el plasmidio Ti, que es el que le permite transferir su ADN a la planta, (Gelvin 2000)], con agitación vigorosa y constante por aproximadamente 2 días en medio LB suplementado con los antibióticos gentamicina 100 μ g/ml, rifampicina 10 μ g/ml y el antibiótico adecuado para la selección del *Agrobacterium* transformado. Stocks de glicerol y pre-inóculos tanto para la preparación de células competentes como para la transformación de *Arabidopsis* por la metodología de inmersión

floral, fueron obtenidos a partir de estos medios líquidos. Los cultivos para la preparación de células competentes y transformación de *Arabidopsis* por inmersión floral, están detallados en 2.3.4 y 2.1.3 respectivamente. Cultivos sólidos de *Agrobacterium* fueron crecidos entre 25 y 28° C en medio LB agar suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente, por aproximadamente 2 días en estufa o cámara de cultivo.

2.3.1 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Las células competentes de *E. coli* fueron preparadas según el protocolo descrito por Inoue y cols. (Inoue y cols. 1990). Se creció un cultivo líquido de 3 ml de *E. Coli* DH5 α en medio LB durante la noche a 37° C con agitación constante. Un volumen de 250 ml de medio LB fue inoculado con el cultivo anterior. Este cultivo se incubó con alta aireación a 25° C hasta obtener una D.O._{600nm} = 0,6. Alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se enfrió por 10 min en hielo y se traspasó a un tubo de centrifuga estéril preenfriado a -20° C en el cual las células fueron colectadas por centrifugación a 2500xg por 10 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 80 ml de amortiguador TB frío (pipes 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM), pH 6,7 ajustado con KOH 5 M. Esta suspensión fue incubada por 10 min. en hielo y posteriormente las células fueron colectadas por centrifugación a 2500xg por 10 min. a 4° C. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 20 ml de amortiguador TB preenfriado. A esta suspensión se le agregó DMSO a una concentración final

de 7 % y finalmente se alicuotó la suspensión en volúmenes de 200 µl en tubos de 1,5 ml estériles preenfriados a -20° C. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta ser usadas.

2.3.2 Transformación de *E. coli* DH5α

50 µl de células competentes DH5α fueron mezcladas con 2 µl de la reacción de ligación o recombinación. Esta mezcla fue incubada durante 30 min. en hielo y posteriormente incubadas a 37° C por 5 min., luego de los cuales se le agregó 1 ml de medio LB. Esta solución fue incubada por 60 min. a 37° C y finalmente las células fueron recolectadas por centrifugación a máxima velocidad (10000xg) por 30 s y resuspendidas en el sobrenadante residual (aproximadamente 20 a 50 µl) y puestas en placas LB agar con el correspondiente antibiótico para su selección.

2.3.3 Extracción de ADN plasmidial desde *E. coli* DH5α

La extracción de ADN plasmidial (lisis alcalina de 10 minutos), se llevó a cabo basado en el protocolo descrito por Zhou y cols. (Zhou y cols. 1990).

Desde un cultivo de noche de *E. coli* transformadas con el vector de interés, se toman 1,5 ml y se sedimentaron por centrifugación durante 10 s en microcentrífuga a máxima velocidad (10000xg). El sobrenadante fue descartado dejando un volumen mínimo para resuspenderlas (50 µl). Las células se resuspendieron totalmente e inmediatamente después se agregó 300 µl de amortiguador TENS (TRIS pH 7,5 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM,

NaOH 0,1 M y SDS 0,5 %) y se mezcló en vortex por 2 s. Luego se agregó 150 µl de acetato de potasio (KAc) pH 4,7 3 M y se mezcló en vortex por 2 s. La suspensión fue centrifugada por 2 min. a máxima velocidad (10000xg) en una microcentrífuga para sedimentar el ADN cromosómico y los residuos celulares. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se le agregó 900 µl de etanol 100 % a temperatura ambiente, inmediatamente el ADN fue sedimentado en microcentrífuga a máxima velocidad (10000xg) por 2 min. El sobrenadante fue descartado y el decantado se lavó dos veces con 1 ml etanol 80 % preenfriado a -20° C. Finalmente el ADN se dejó secar al aire y se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas con RNAsas 10 µg/ml. Para secuenciación o recombinaciones las extracciones de ADN plasmidial fueron realizadas utilizando un Kit comercial (MIDIPrep Promega).

2.3.4 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Las bacterias (*Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101) fueron crecidas a 28° C en medio líquido de LB hasta alcanzar la fase log (tiempo de duplicación de aproximadamente 2 h). 2 ml de este cultivo fueron transferidos a 50 ml de medio LB fresco y este cultivo se creció hasta obtener una D.O._{600nm} de 0,5. Posteriormente las células fueron enfriadas durante 10 min. en hielo y sedimentadas a 3000xg por 5 min., luego de lo cual fueron resuspendidas en 1 ml de CaCl₂ 20 mM. Las células fueron alicuotadas en tubos de 1,5 ml en 200 µl y fueron almacenadas a -80° C hasta ser

utilizadas. Este protocolo se basó en la publicación de Chen y cols. (Chen y Kado 1994).

2.3.5 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Al igual que el protocolo descrito en la sección 2.3.4, la transformación de *Agrobacterium* se realizó basada en la metodología descrita por Chen y Kado. (1994). 100 μ l de células competentes de *Agrobacterium* cepa GV3101, fueron mezcladas con 1 μ l del vector binario de interés (a una concentración de 1 μ g/ μ l). Dicha mezcla fue congelada con nitrógeno líquido por 5 min., posteriormente se descongeló la mezcla a 37° C durante 25 min. Inmediatamente se le agregó 1 ml de medio LB y se incubó por 3 h a 28° C con agitación suave. Finalmente las células fueron recolectadas por centrifugación durante 1 min. a máxima velocidad (10000xg) y el sobrenadante fue descartado dejando aproximadamente 100 μ l de medio para resuspender las células, las cuales fueron puestas en medio LB agar suplementado con gentamicina 100 μ g/ml, rifampicina 10 μ g/ml y el antibiótico de selección del *Agrobacterium* transformado. Las placas fueron incubadas durante 2 días a 28° C.

2.4 Clonación de genes de interés en sistema Gateway.

Los CDS de las tres GAMMA-ADRs fueron clonados sin codón de stop en el vector de entrada del sistema Gateway pENTR SD-TOPO (INVITROGEN). CDS de *EPSILON-ADR* clonado en el mismo vector pero con codón de stop

incluido (U17999, ABRC, Stock Center), fue obtenido desde el stock center ABRC. Los partidores usados para amplificar los CDS se resumen en la Tabla 2. Para sobreexpresar los genes de interés se utilizó el vector compatibles con el sistema Gateway pGWB6 (Nakagawa y cols. 2007) que permite fusionar en amino terminal con la proteína GFP.

Tabla 2. Partidores para amplificar CDS de los genes en estudio. Partidores incluyen secuencia de compatibilidad con vector de entrada del sistema Gateway pENTR (CACC). Partidores derechos incluyen codón de inicio (ATG). Partidores reversos excluyen codón de stop.

	PRIMER	SECUENCIA	DIRECCIONALIDAD	Tamaño CDS (pb)
<i>Gammal</i> (At1g23900)	Gm1-1	5' CACCATGAATCCCTTTTCTTCTGGTA '3	Forward	2628
	Gm1-2	5' TCACAACCCCGGAGGAAAGTTGCT '3	Reverse	
<i>Gammall</i> (At1g60070)	Gm2-1	5' CACCATGAATCCATCTCTCCGGCA '3	Forward	2601
	Gm2-2	5' TAACCCACGTTGGAAATTTGTTGATT '3	Reverse	
<i>Gammalll</i> (At1g23940)	Gm3-1	5' CACCATGGAATGGTTGCTCTAGTGAA '3	Forward	1488
	Gm3-2	5' TGCAAGCAATGAGCCAGCCCTCCTT '3	Reverse	
<i>Epsilon</i> (At1g31730)	EPA1	5' ATGGAGCAGCTAAAGACAAATGGAA '3	Forward	2814
	EPA2	5' GCCGAGGAGATCTTTGACAGTGTA '3	Reverse	

2.5 Extracción de ARN desde material vegetal

Entre 50 y 100 mg de tejido vegetal fue congelado en nitrógeno líquido y luego molido hasta obtener un polvo homogéneo. Sin descongelarlo se agregó 1 ml de TRIZOL (INVITROGEN). Se mezcló con vortex por 30 segundos y se incubó por 5 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 250 μ l de cloroformo, se mezcló con vortex por 15 segundos y se incubó por 3 min. a temperatura ambiente. Luego de la incubación se centrifugó por 12000xg durante 15 min. a 4° C. La fase superior donde se encuentran los ácidos nucleicos se transfirió a un tubo con 500 μ l de 2-propanol y se incubó la mezcla por 5 min. a temperatura ambiente sin mezclar. Para decantar el ARN se centrifugó a 12000xg por 15 min. a 4° C. El sobrenadante fue descartado y el ARN precipitado se lavó con etanol al 75% preenfriado, preparado con agua pretratada con DEPC (SIGMA). Finalmente se precipito por centrifugación a 8000xg a 4° C por 5 min., se descartó el sobrenadante y el ARN precipitado se dejó secar por 15 min. El ARN total se resuspendió en 30 μ l de agua pretratada con DEPC. Para eliminar la contaminación con ADN se trató el ARN purificado con DNAsa I. En 100 μ l totales de reacción con 4 μ l de DNAsal (FERMENTAS), se incubó por 30 min a 37° C. Para detener la digestión se agregó EDTA y se incubó por 10 min. a 65° C. Para lavar el ARN y disminuir el volumen se precipitó con 0,3 volúmenes de LiCl 10 M y se incubó por 20 min. a -20° C. Por último, se decantó el ARN por centrifugación a 12000xg a 4° C durante 30 min.

Finalmente se lavó, seco y resuspendió como se describió anteriormente. Para almacenarlo se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -80°C .

2.6 Análisis de expresión: RT-PCR, PCR cuantitativo

A partir de ARN total pretratado con DNAsal y cuantificado por espectrofotometría, se preparó cADN utilizando un kit comercial (FirstStrand cADN Synthesis Kit. FERMENTAS).

Los experimentos de PCR cuantitativo, fueron realizados utilizando el equipo APPLIED BIOSYSTEM ONE STEP y Master mix SYBR Green Fast (APPLIED BIOSYSTEM). Los partidores utilizados en este estudio y sus especificaciones están resumidos en la Tabla 3. El protocolo de PCR cuantitativo utilizado consta de 10 min. a 95°C y 40 ciclos que consisten en 3 s a 95°C y 30 s a 60°C . Como gen de referencia se utilizó Actina 2 (Ito y cols. 2001). Los datos de PCR cuantitativo fueron expresados utilizando el algoritmo de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Schmittgen y Livak 2008)

2.7 Electroforesis de geles de agarosa para análisis de ADN

Los geles de agarosa se prepararon entre 1 y 1,7 % en amortiguador TAE 1X, con bromuro de etidio (EtBr) $0,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Como marcador de peso molecular se utilizó escalera de 1Kb (FERMENTAS) a una concentración de $100\ \text{ng}/\mu\text{l}$. Los geles fueron corridos en amortiguador TAE 1X a 100 V de potencia.

Tabla 3. Partidores utilizados en ensayos de PCR cuantitativo en este estudio.

Nombre	Secuencia	Dirección	Amplicon	Referencias
EORF6	ATCGATCCCGAGAAACAGAGACT	Forward	EPSILON	Propios
EPA129R	TGGCGGTTGAACAGGGGTTTGATT	Reverse		
LM762	TCCTCTTAACCCAAAGGCCAACAG	Forward	ACT2	Haga et al.2007
LM763	AATCCAGCACAAATACCCGGTTGTAC	Reverse		
LM766	ACAGTCACAGATCTTTGGGTATC	Forward	Histone H4	Haga et al.2007
LM767	TCCTTGAAATGTTATCCCTCAGAAC	Reverse		
LM768	GATGTGCATTGGTATCATTTGTGC	Forward	KNOLLE	Haga et al.2007
LM769	AGGATTAAAGACATCCATTGGGTAC	Reverse		
LM770	ATGACTTCCTCGTTCCGATTGTTT	Forward	CYCB1;1	Haga et al.2007
LM771	TCACCAAGAACTTGACGGTTTC	Reverse		
LM011	GTTTGACAAATGGCGGTTGGT	Forward	ARR7	Propios
LM012	AGCCCCCTTTGCCCTCCCATCTA	Reverse		

2.8 Anticuerpos policlonales

2.8.1 *Diseño y Obtención de Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales fueron obtenidos desde conejos inoculados con un péptidos de 14 aminoácidos, los cuales fueron seleccionados para cada proteína en estudio utilizando algoritmos que usan criterios de hidrofobicidad, accesibilidad y flexibilidad del péptido obteniéndose un índice de antigenicidad en el contexto de la proteína completa (Jameson y Wolf 1988; Kolaskar y Tongaonkar 1990; Margalit y cols. 1987). A su vez, se tomó en cuenta para la elección del péptido, que éste fuera único en las proteínas en estudio, para asegurar la especificidad de los anticuerpos generados. La Figura 2, muestra un esquema de las proteínas en estudio y la ubicación del péptido seleccionado.

2.8.2 *Purificación de anticuerpos policlonales por columnas de afinidad*

Cada anticuerpo fue purificado desde el suero inmune por cromatografía de afinidad usando el péptido acoplado. Se utilizó columna de sefarosa 4B CNBr-activado (Amersham Pharmacia Biotech AB). Una vez purificados, se cuantificó la concentración de proteínas utilizando una curva estándar de BSA. La eficiencia y especificidad se determinó por inmunoblot.

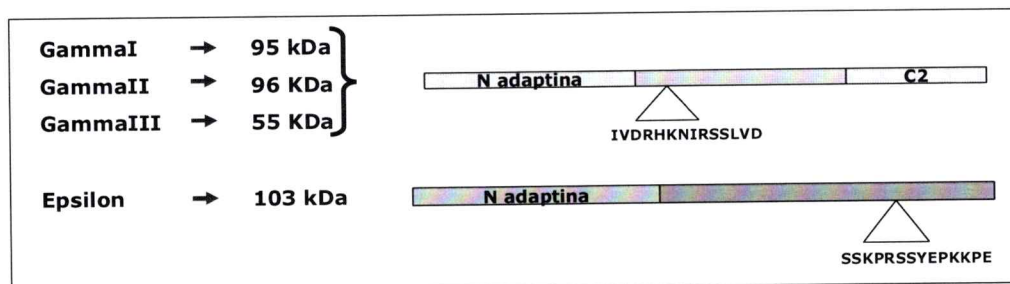


Figura 2. Esquema de las proteínas en estudio y la ubicación del péptido seleccionado para obtención de anticuerpos policlonales. GAMMAI-ADR (AT1G23900), GAMMAII-ADR (AT1G600700), GAMMAIII-ADR (AT1G23940) contienen dos dominios conservados. EPSILON-ADR (AT1G31730) posee un dominio conservado.

2.8.3 Expresión heteróloga de EPSILON-ADR en bacterias utilizando un sistema inducible por IPTG.

El clón U17999 obtenido desde el Stock Center ABRC, contiene el CDS de *EPSILON-ADR* con codón de stop. Este clón es compatible con el sistema Gateway, por lo tanto, mediante recombinación utilizando LR CLONASA, generamos una fusión en N-terminal con HIS-TAG, en un vector de expresión de bacterias inducible por IPTG (pET300/NT-DEST, INVITROGEN). Bacterias competentes BL21 (DE3) pLys (INVITROGEN) fueron transformadas con la construcción y seleccionadas en Medio LB-agar suplementado con Ampicilina 200 µg/ml. La inducción se llevó a cabo siguiendo el protocolo sugerido por Novagen para este tipo de vectores (pET System). Un cultivo de D.O.₆₀₀=0,6 se incubó por 0, 1, 2 y 3 h a 37° C en LB líquido suplementado con IPTG (Calbiochem) al 1 mM. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad y se lisaron con buffer 2X Laemmli (SDS 4

%, glicerol 20 %, β -mercaptoetanol 10 %, azul de bromofenol 0.004 % y TRIS-HCl 0.125 M. pH 6,8) incubadas 5 min. a 100° C.

2.9 Obtención de extractos proteicos y análisis por inmunoblot

2.9.1 Obtención de extractos de proteínas totales desde tejido vegetal.

Entre 200 y 400 mg de tejido vegetal fue congelado en nitrógeno líquido y molido en mortero de porcelana o con puntas de teflón estériles hasta obtener un polvo homogéneo. Luego se agregó entre 200 a 400 μ l de buffer de extracción (50 mM de TRIS-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA pH 8,0, β -mercaptoetanol al 0,25 %, 1 mM de PMSF e IGEPAL al 1 %) preenfriado a 4° C. Se mezcló por vortex e incubó por 5 min. a 100° C. Finalmente, se mezcló por vortex y se centrifugó a máxima velocidad en microcentrífuga a 4° C por 5 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el método de BCA.

2.9.2 Obtención de extractos microsomales crudos y fracciones solubles desde tejido vegetal

Plantas de Arabidopsis de 7 días fueron molidas en frío en presencia de sacarosa 0,5 M (para 50 g de solución: 8 g de sacarosa para gradiente MERCK; 5 ml de KH_2PO_4 1 M pH 6,65; 250 μ L de MgCl_2 1 M. Llevar a 50 g de solución con agua destilada estéril). El macerado fue filtrado usando gasa estéril y posterior el filtrado se centrifugó a 14000xg por 10 min. a 4° C. Se rescató el sobrenadante y se centrifugó a 100.000xg por 1 h a 4° C. El

sobrenadante corresponde a la fracción S100 y el sedimentado fue resuspendido en STM (para 50 ml de solución: 8,56 g de sacarosa para gradiente MERCK; 1 ml de TRIS 1 M pH 7,5 y 100 μ L de $MgCl_2$ 1 M) corresponde a la fracción P100. Finalmente las proteínas fueron cuantificadas por BCA y almacenadas a -80° C hasta que se realizó el inmunoblot.

2.9.3 Inmunoblot

Geles de poliacrilamida 29:1 al 10% fueron corridos en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) y transferidos toda la noche a membrana de PVDF a 150 mA, usando buffer que favorece la transferencia de proteínas de alto peso molecular (Para un litro: 5,8 g de TRIS base, 2,9 g de Glicina, Metanol al 20% e Isopropanol al 2,5%). La membrana cargada se lavó con TBS (1,2 g/L de TRIS base y 9 g/L de NaCl, llevar a pH 7,4 usando HCl fumante) para eliminar exceso de Metanol. La membrana fue bloqueada usando una solución de leche descremada al 5% en TBS-Tween20 (TBS suplementado con 0,05 % de Tween 20). El anticuerpo primario se preparó en solución de bloqueo y la membrana se incubó por 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Los lavados se realizaron con TBS-Tween20 3X 10 min. El anticuerpo secundario se preparó en solución de bloqueo y la membrana se incubó por 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Los lavados se realizaron con TBS-Tween20 3X 10 min. Finalmente la membrana se lavó con TBS para sacar el exceso de detergente. La

membrana se reveló con un kit comercial (SuperSignal West Pico Chemiluminicent Substrate. ThermoSCIENTIFIC). Los anticuerpos primarios y secundarios usados en este estudio se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos usados en este estudio. Ip: inmunoprecipitación; if: inmunofluorescencia; wb: western blot; E: ELISA

<i>Anticuerpos</i>	<i>Usos</i>	<i>Origen</i>	<i>Procedencia</i>
<i>Epsilon-ADR</i>	<i>ip, if, wb, E</i>	<i>conejo</i>	<i>Propio</i>
<i>Knolle</i>	<i>if, wb</i>	<i>conejo</i>	<i>Gerd Jurgens</i>
<i>Knolle</i>	<i>if</i>	<i>rata</i>	<i>Gerd Jurgens</i>
<i>GFP</i>	<i>if</i>	<i>conejo</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>BIP</i>	<i>wb</i>	<i>cabra</i>	<i>Santa Cruz</i>
<i>GNOM</i>	<i>if, wb</i>	<i>conejo</i>	<i>Gerd Jurgens</i>
<i>C11 (actina)</i>	<i>wt</i>	<i>cabra</i>	<i>Santa Cruz</i>
<i>anti rabbit Alexa fluor 488</i>	<i>if</i>	<i>raton</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>anti mouse Alexa fluor 488</i>	<i>if</i>	<i>conejo</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>anti rabbit HRP</i>	<i>wb</i>	<i>raton</i>	<i>Sigma</i>
<i>anti mouse HRP</i>	<i>wb</i>	<i>conejo</i>	<i>Sigma</i>
<i>anti goat HRP</i>	<i>wb</i>	<i>conejo</i>	<i>Santa Cruz</i>

2.9.4 Cuantificación de proteínas mediante el método BCA

Se preparó una curva de calibración con BSA de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg en 20 µl totales en agua destilada estéril. Las muestras a cuantificar se prepararon de la misma forma a 20 µl totales. Paralelamente se preparó la solución de BCA (SIGMA)-Sulfato de cobre (176,6 µl y 3,6 µl respectivamente) y se agregó 180 µl de esta solución a cada preparado de proteínas. Se incubó por 30 min. a 37° C y luego 10 min. a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm.

2.9.5 Inmunoprecipitación de EPSILON-ADR de *Arabidopsis thaliana*

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se utilizó un kit comercial (Co-IP, PIERCE), siguiendo las especificaciones y sugerencias del fabricante. El anticuerpo acoplado a la resina (80 µg) se purificó por afinidad (sección 2.8.2) y se dializó contra buffer PBS. Se utilizaron 5g de tejido de planta completa de 10 semanas el cual fue congelado en nitrógeno líquido, triturado y resuspendido en 2 ml de buffer de lisis. Se aplicó vortex y se agregó 10 ml de buffer PBS para diluir el buffer de lisis. Finalmente se centrifugó a 9000xg por 10 min a 4° C y se rescató el sobrenadante. La concentración de proteínas fue determinada por el método BCA. 500 µg de proteína fueron cargados por columna. Todos los lavados fueron realizados con buffer PBS.

2.9.6 Tinción con cloruro de plata para geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Un gel SDS-PAGE cargado con proteínas de las eluciones de la inmunoprecipitación, se tiñó con Cloruro de plata. Se lavó el gel con etanol al 30 %, 3 veces por 12 min. Luego con agua destilada 2 veces por 12 min. La sensibilización se realizó con ditionito de sodio al 0,025 % p/v por 1 min. Para sacar el sensibilizador se lavó con agua destilada 3 veces por 20 s. El gel se tiñó con una solución de nitrato de plata (0,2 % p/v y formaldehído al 0,008 % v/v) por 20 min. Se siguió con un lavado con agua destilada por 1 min. Finalmente se reveló con 30 ml de carbonato (Na_2CO_3 al 6 % p/v y formaldehído al 0,4 % v/v) hasta que se oscureció la solución, se descartó y

agregó el resto de la solución de carbonato. Para detener la reacción se agregó 50 ml de solución acetato (3,5 % v/v en agua destilada), se esperó a que burbujee y se agregó el resto de la solución. Finalmente, el gel se lavó con agua destilada.

2.10 Tratamientos e incubaciones en planta completa y células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*

2.10.1 Tratamientos con citoquinina y sacarosa.

Plantas crecidas por 7 días en $\frac{1}{2}X$ MS suplementado con sacarosa al 1 % fueron tratadas con 100 nM de t-zeatina (SIGMA) por 30, 60 y 120 min, con agitación suave y constante. Como control se usaron tratamientos en el solvente ($\frac{1}{2}X$ MS). Las plantas post-tratamiento fueron congeladas en Nitrógeno líquido y almacenadas a -80° C hasta ser usadas para extracción de ARN total.

Plantas crecidas por 7 días en $\frac{1}{2}X$ MS suplementado con sacarosa al 1 % fueron tratadas con $\frac{1}{2}X$ MS, $\frac{1}{2}X$ MS suplementado con sacarosa 30 mM y $\frac{1}{2}$ MS suplementado con sacarosa 130 mM por 24 horas con agitación suave y constante. Las plantas post-tratamiento fueron congeladas en Nitrógeno líquido y almacenadas a -80° C hasta ser usadas para extracción de ARN total.

2.10.2 Tratamientos con modificadores de ruta secretora.

Plantas crecidas en condiciones estériles fueron incubadas por 1 h. a temperatura ambiente en ½X MS suplementado con sacarosa al 1 % y BreFeldina A (BFA) 100µM, con agitación suave y constante. Como control del tratamiento se incubó sólo con ½X MS suplementado con sacarosa.

2.10.3 Sincronización de ciclo celular en cultivos de células en suspensión de Arabidopsis

Cultivos de células en suspensión MM2 (Menges y Murray 2004) se mantuvieron semanalmente crecidas en medio MS suplementado con sacarosa al 3 %, NAA 0,5 mg/l y Kinetina 0,05 mg/l. Una vez por semana las células fueron diluidas 1:10 en medio fresco (Menges y Murray 2004)

La sincronización del ciclo celular se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Menges y Murray (Menges y Murray 2002) Una alícuota de 40 ml desde un cultivo de 7 días fue llevado a 200 ml de medio fresco, suplementado con 4 mg/ml de afidicolina (Calbiochem) e incubado durante 21,5 h a 23° C con alta agitación. Las células fueron lavadas vigorosamente con un litro de medio fresco pasándolas a través de una gasa estéril, seguido de centrifugación a 1000xg por 1 min., con el objetivo de remover completamente la afidicolina. Las células se resuspendieron en 250 ml de medio fresco y se incubaron en cámara de crecimiento para permitir su crecimiento. Se tomaron uno o dos ml de muestra a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h. post lavados. Las muestras tomadas se centrifugaron a máxima velocidad

en microcentrífuga por 5 min., se descartó el sobrenadante y el decantado se congeló con nitrógeno líquido y se almaceno a -80° C hasta que fueron usadas para extraer ARN total.

2.11 Inmunolocalización en planta completa

Este procedimiento se basa en protocolo de Lauber y cols. (Lauber y cols. 1997). Plantas de 5 a 6 días de edad crecidas en condiciones estériles fueron fijadas por 1 h en p-formaldehído fresco al 4 % y lavadas tres veces en agua destilada por 10 min. Alrededor de 18 plantas se montaron en portaobjetos Super Frost y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se pueden almacenar los portaobjetos cargados con plantas por 1 mes a -20° C o se ocupan de inmediato para el proceso de inmunolocalización. Se dibuja una película con Super PapPen alrededor de las plantas formando una cámara y se rehidratan las plantas con MTSB (50 mM PIPES, 5 mM EGTA, 5 mM $MgSO_4$ y ajustar con KOH a pH 6,9-7,0) Para permeabilizar el tejido se trata con Driselasa al 2 % en MTSB por 30 a 40 min. a 37° C. Se lava 3 veces cada 5 min. con PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, KH_2PO_4 0,2 g/L y Na_2HPO_4 1,15 g /L. Ajustar a pH 7,4 con KOH 10 M). Luego para permeabilizar las membranas, se incuba por 1 h a temperatura ambiente en 10 % DMSO y 3 % de NP40 en MTSB. Se lava seis veces cada 5 min. con PBS. Posteriormente se incuba con BSA al 4 % en PBS por 1h a 37° C. Luego se incuba con el anticuerpo primario en BSA 4 % en PBS por 4 h a temperatura ambiente en una cámara sellada para evitar la evaporación

del anticuerpo. Los lavados se realizan con PBS Tween 20 al 0,01% tres veces cada 10 min. y luego con PBS tres veces cada 10 min. La incubación con el anticuerpo secundario (asociado a fluoróforo) se realiza en PBS por 4 hrs. a 37° C en oscuridad y se lava cuatro veces con PBS cada 10 min. y dos veces en agua destilada cada 10 min. Finalmente para teñir con DAPI (1 µg/ml), se prepara la tinción en agua destilada y se incuba por 30 min. a 37° C en oscuridad. Los seis lavados finales son cada 5 min. usando agua destilada. Para montar se escurre el agua de los portas y se agrega 50 µl de Citifluor y se cubre con cubreobjeto. Las muestras listas pueden almacenarse a 4° C por hasta tres meses.

2.12 Clarificación de tejido para cuantificación de raíces laterales (LR) y primordios (LRP) en *Arabidopsis thaliana*

Plántulas de 7 días fueron fijadas en etanol al 70% durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se empezó la clarificación del tejido que lo transparenta permitiendo visualizar estadios muy tempranos del desarrollo de raíces laterales (Malamy y Benfey 1997). Las plántulas fueron incubadas a 62° C por 40 min. en Solución I (0,24 N HCl en metanol al 20 %). La solución fue reemplazada por Solución II (NaOH 7 % en etanol al 60 %) y se incubó por 20 min. a temperatura ambiente. Las plántulas fueron rehidratadas en gradientes de etanol desde 40 a 10 %, a temperatura ambiente por 2 h con cada solución. Finalmente se incubó por 2 h en Solución III (etanol al 5 % y glicerol al 25 %). Las plántulas fueron montadas

cuidadosamente en portaobjetos con glicerol al 50 %. La cuantificación se llevó a cabo bajo un microscopio con óptica Nomarski con un objetivo 20X.

2.13 Genotipificación de mutantes insercionales

2.13.1 Extracción de ADN genómico de hoja de *Arabidopsis*

Este protocolo se basó y fue modificado de Xin y cols. (Xin y cols. 2003). Un pequeño trozo de hoja se molió en un tubo de 1,7 ml con una punta de teflón estéril en presencia de 200 μ l de tampón de extracción (200 mM TRIS pH 8,0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA y 0,5 % SDS). Se mezcló por vortex durante 5 s y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min. a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio al que se le agregó 200 μ l de isopropanol absoluto. Se mezcló por vortex durante 5 s. Luego por centrifugación durante 5 min. a máxima velocidad, se precipitó el ADN y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó el ADN precipitado con 1 ml de etanol al 80 % pre-enfriado y se centrifugó, descartando el sobrenadante. El ADN se dejó secar en los tubos boca a bajo sobre un papel absorbente durante 30 min. Finalmente el ADN fue resuspendido en 20 μ L de agua estéril nano-pura y se almacenó a -20° C.

2.13.2 Genotipificación por PCR

4 μ L de ADN genómico se usaron como templado para la genotipificación de mutantes insercionales, usando partidores específicos. En este estudio se

genotificaron 11 líneas insercionales cuya descripción se resume en la Tabla 5.

Tabla 5. Mutantes insercionales caracterizadas en este estudio. a: ausente, n.d: no determinado, p: presente

	GERMOPLASMA	ORIGEN	BACKGROUND	GENOTIPO	TRANSCRI
GAMMAI (AT1G23900)	Salk_109928C	ABRC	Col-0	Homocigotas	n.d
	Salk_032500C	ABRC	Col-0	Homocigotas	n.d
	Salk_032502	ABRC	Col-0	Homocigotas	n.d
GAMMAII (AT1G60070)	Salk_028208	ABRC	Col-0	Homocigotas	a
	Salk_043364C	ABRC	Col-0	Homocigotas	a
GAMMAIII (AT1G23940)	Salk_082956	ABRC	Col-0	Homocigotas	a
	Salk_075177	ABRC	Col-0	Homocigotas	a
	Salk_126133	ABRC	Col-0	Homocigotas	a
EPSILON (AT1G31730)	Salk_125109	ABRC	Col-0	Homocigotas	p
	Salk_136213	ABRC	Col-0	Homocigotas	p
	CS857164	ABRC	Col-0	Homocigotas	a

2.14 Cuantificación de glucosa total en semillas de *Arabidopsis thaliana*

100 mg. de semillas Col-0 y *eps1.3* fueron molidas y homogenizadas en nitrógeno líquido utilizando morteros de porcelana. El polvo de semilla congelado fue resuspendido en 500 µl de agua estéril miliQ, y centrifugado a 14000xg por 3 min. a 4° C. Se rescataron 250 µl de sobrenadante y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones descritas arriba. Finalmente se prepararon diluciones que permitan leer en el espectrofotómetro dentro del rango dinámico del equipo y la sensibilidad del ensayo. Usando el protocolo descrito en el kit utilizado, se cuantificaron mg/µl de glucosa. 10 µl de una dilución 1:5 del extracto de semillas fueron

mezclados con 100 μ l de Glucose Assay Reagent (SIGMA) y se incubó por 15 min. a temperatura ambiente antes de medir a 340 nm. Los datos fueron normalizados por dos controles, muestra blanco de homogenizado de semillas y muestra blanco de glucose assay reagent. Experimento realizado en triplicado técnico y biológico.

2.15 Análisis de microscopía confocal, epifluorescente y Nomarski

Se utilizó un microscopio invertido Olympus IX71. Las imágenes de transmisión fueron analizadas con microscopía Nomarski (DP20 y DP60). La microscopía confocal se realizó utilizando un equipo Olympus espectral Fluo View 1000, contando con los siguientes LASERs: diodo de 405 nm, multilínea de Argón (457 nm, 488 nm y 515 nm), y LASER HeNe de 543 nm. Las imágenes fueron editadas con el software Photoshop CS2.

2.16 Análisis estadístico de datos

Las diferencias significativas entre medias se determinaron utilizando ANOVA (Análisis de Varianza) combinada con la prueba de Tukey en los casos que se comparó entre más de dos muestras. Se utilizó siempre una prueba de un factor. En los casos que se comparó entre dos muestras se utilizó la prueba de t student con un $p < 0,05$. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism 3.0.

3 Resultados

3.1 Capítulo I: EPSILON-ADR en la célula vegetal y su posible papel en desarrollo y división celular

Dado que los perfiles de expresión génica y la acumulación de proteínas, así como su ubicación subcelular y distribución *in planta*, son herramientas que entregan información útil para generar una hipótesis acerca de las funciones de una determinada proteína. En esta tesis se utilizó esta estrategia experimental para obtener información relevante acerca de EPSILON-ADR.

3.1.1 El transcrito de EPSILON-ADR se encuentra enriquecido en silicuas y cultivos de células en suspensión

Mediante ensayos de PCR cuantitativo, se construyó un perfil de expresión, determinando la abundancia relativa de transcritos de *EPSILON-ADR* en distintos tejidos y estados de desarrollo de la plantas. (Figura 3). Células en suspensión y silicuas son los tejidos que acumulan mayores niveles de transcrito de *EPSILON-ADR*. La menor acumulación de transcrito se observa en flores, hojas y tallos. Este perfil de expresión sugiere que los tejidos con mayor tasa de división celular acumulan altas concentraciones del transcrito del gen en estudio.

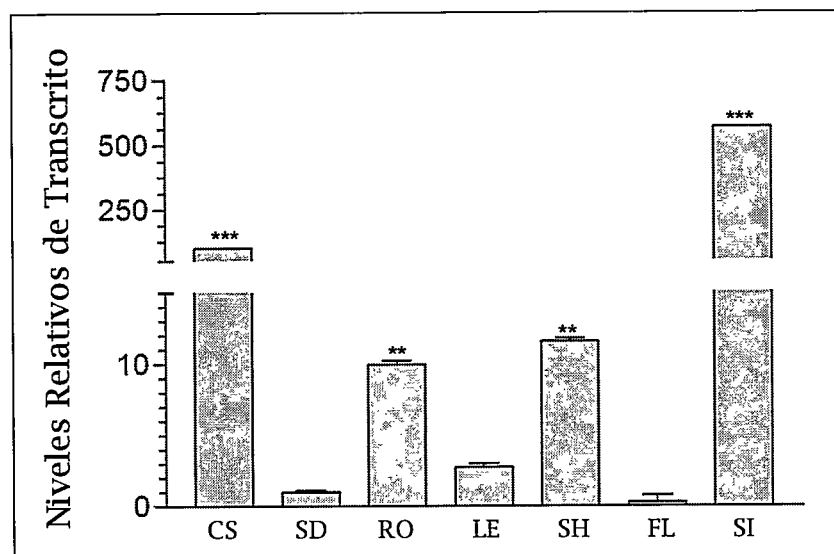


Figura 3. *EPSILON-ADR* se expresa mayoritariamente en cultivos de células en suspensión y silicuas. Niveles relativos del transcrito de *EPSILON-ADR* determinados por PCR cuantitativo. Se comparó contra plántulas de 7 días (SD), utilizando actina 2 como gen de referencia. CS, células en suspensión; SD, plántulas de 7 días; RO, raíces; LE, hojas; SH, tallo; FL, flores; SI, silicuas. Experimento realizado en triplicado biológico y técnico. Se muestra un experimento representativo de una muestra biológica en sus respectivas replicas técnicas. Las barras representan la media y su respectivo error estándar. Diferencias significativas respecto a SD, fueron establecidas mediante Prueba de Tukey (ANOVA, $p < 0,05$): **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

3.1.2 El ciclo celular regula la expresión de *EPSILON-ADR* en plantas

Existen estímulos medioambientales y hormonas que son capaces de inducir la división celular en plantas. Con estos antecedentes analizamos si citoquinina y sacarosa pueden regular la expresión de este gen, ya que se ha reportado que ambas sustancias inducen división celular en plantas (Polit y cols. 2003). Las plantas tratadas con 100 nM de tras-zeatina (citoquinina endógena) muestran inducción del transcrito de *EPSILON-ADR* a los 30 min. de tratamiento, alcanzando su máximo a los 60 min. A las 2 h, sin embargo, la expresión decae a niveles comparables con el control sin tratamiento (Figura 4A), sugiriendo que *EPSILON-ADR* es activado en la respuesta temprana a citoquinina. Como

control de la inducción por citoquinina, analizamos la abundancia del transcrito de *ARR7* (Lee y cols. 2007), un receptor de respuesta a citoquinina, cuya transcripción es activada tempranamente en tratamientos con la hormona (Figura 4B). Paralelamente, plantas tratadas con sacarosa 0, 30 y 130 mM durante 24 h, mostraron inducción del *EPSILON-ADR* y de genes de división celular como *CICLINA-B1* [(Ito 2000) Figura 4C y D] de una manera dosis dependiente. Estos resultados muestran que *EPSILON-ADR* es inducido por compuestos que promueven la división celular en plantas.

Paralelamente, para relacionar a nuestro gen en estudio y su expresión con un proceso celular en particular, se analizaron los elementos CIS presentes en las putativas secuencias promotoras del gen en estudio. Utilizando la Base de Datos PLACE identificamos elementos en CIS del tipo MSA (Mitosis Sequence Activator (Ito y cols. 1998), lo que sugiere que el promotor de este gen estaría siendo activado durante división celular (Figura 5A).

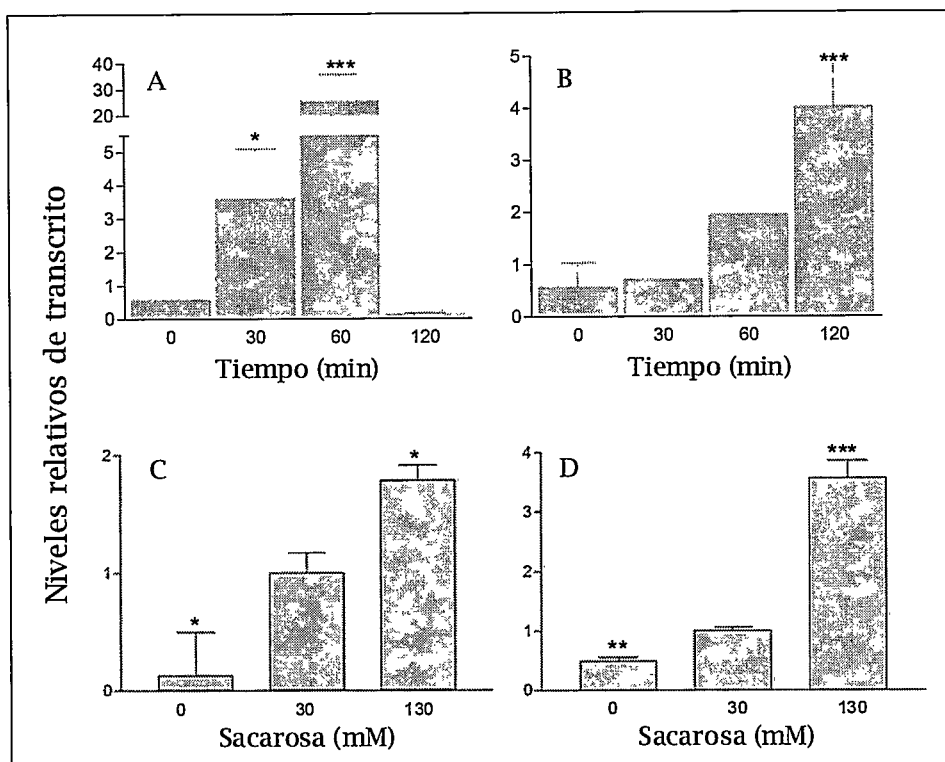


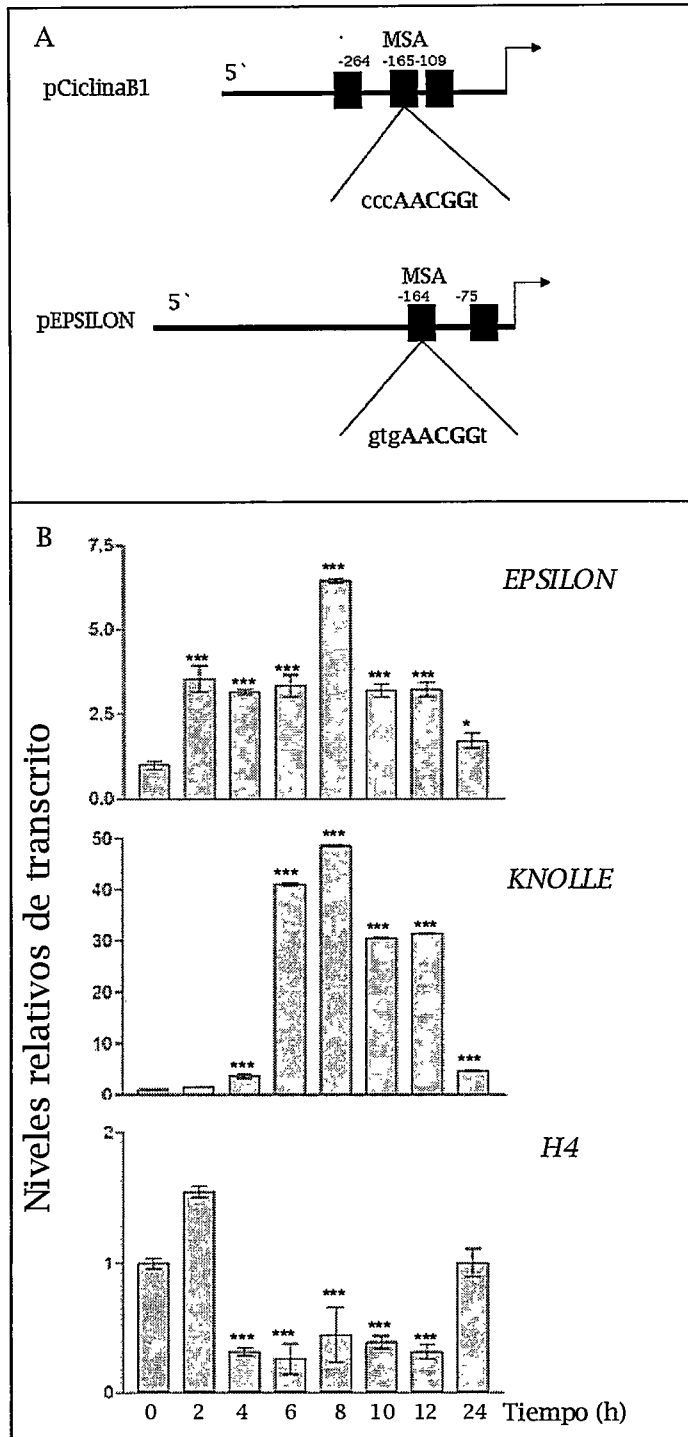
Figura 4. *EPSILON-ADR* es inducido por citoquinina y sacarosa. Niveles relativos de transcritos de *EPSILON-ADR* (A) y *ARR7* (B) determinados por PCR cuantitativo. Se comparó contra plantas no tratadas con la hormona. Barras muestran los niveles de transcrito en plantas tratadas con t-Zeatina 100 nM por 0, 30, 60 y 120 min. Las barras representan la media de una réplica biológica con su respectiva réplica técnica y el error estándar. Niveles relativos de transcritos de *EPSILON-ADR* (C) y *CILINA B1* (D), determinados por PCR cuantitativo en plantas pretratadas por 24 horas sin sacarosa, con 30 ó 130 mM de sacarosa. Se comparó contra plantas tratadas con 30 mM de sacarosa. Las barras representan la media de una réplica biológica con su respectiva réplica técnica y el error estándar. Se utilizó actina 2 como gen de referencia en ambos experimentos. Experimentos realizados en triplicado biológico y técnico. Se muestra un experimento representativo. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey (ANOVA $p < 0,05$). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$, respecto a tiempo 0 (A y B) y 30 mM de sacarosa (C y D)

Estos resultados de expresión y análisis de elementos CIS nos sugieren la inducción de la expresión de *EPSILON-ADR* durante la división celular. Para abordar esta hipótesis, utilizamos cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*, y llevamos a cabo la sincronización del ciclo celular usando

afidicolina, droga que detiene reversiblemente el ciclo celular durante la fase S (Menges y Murray 2002). En la Figura 5B, se muestran los niveles de expresión relativos de los genes *KNOLLE* [marcador transcripcional de fase M, (Haga y cols. 2007)], *H4* [*HISTONA 4*, marcador transcripcional de fase S, (Zhang y cols. 2005)] y el perfil de expresión relativo de *EPSILON-ADR* durante la progresión del ciclo celular. *EPSILON-ADR* presenta un máximo de expresión que coincide con el marcador transcripcional de fase M, *KNOLLE*. Asimismo, los más bajos niveles de la expresión de gen coinciden con el marcador transcripcional de fase S (Figura 5B).

Estos resultados junto con la presencia de elementos CIS activadores de mitosis (Figura 5A), así como la inducción con citoquinina y sacarosa (Figura 4), son evidencias que asocian la expresión del gen que codifica para la proteína *EPSILON-ADR* con el proceso de división celular en *Arabidopsis*.

Figura 5 (Página siguiente). Expresión de *EPSILON-ADR* es regulada durante el ciclo celular. A. Secuencia río arriba del codón de inicio de *EPSILON-ADR*, presenta elementos en CIS, comunes en genes que son expresados durante división celular. Arriba, elementos MSA (mitosis specific activator) presentes en el promotor de Ciclina B1;1, descrito por Ito y colaboradores (2001), abajo, putativa secuencia promotora de *EPSILON-ADR*. B. Células en suspensión de rápida división fueron utilizadas para sincronizar ciclo celular. Las células se trataron por 21,5 h con 5 μ M de afidicolina. Se recolectaron muestras cada 2 h post tratamiento. Como marcadores transcripcionales de la progresión del ciclo celular se usaron Histona 4 (H4) y *KNOLLE*. Los niveles relativos de transcritos se analizaron mediante PCR cuantitativo, comparando contra el tiempo 0 y utilizando actina 2 como gen de referencia. Experimentos realizados en triplicado biológico y técnico. Se presenta un gráfico representativo de una muestra biológica con sus respectivas replicas técnicas. Las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas fueron determinadas por la prueba de Tukey (ANOVA, $p < 0,05$). * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$



3.1.3 EPSILON-ADR es una proteína tejido específica asociada a membranas

3.1.3.1 Diseño, obtención y especificidad de anticuerpos policlonales.

Para determinar la localización subcelular de EPSILON-ADR en plantas se diseñaron y obtuvieron anticuerpos policlonales en conejo a partir de un péptido de 14 aminoácidos (Figura 2). El anticuerpo fue purificado desde el suero inmune utilizando cromatografía de afinidad, uniendo el péptido. Para la caracterización de los anticuerpos se usó expresión heteróloga de la proteína EPSILON-ADR en *E. coli* utilizando un sistema inducible por IPTG (Figura 6). Como observamos en la Figura 6, sólo se visualiza la proteína EPSILON-ADR en extractos proteicos de bacterias crecidas en presencia de IPTG, sin embargo, en ausencia del inductor el anticuerpo no reconoce bandas. La especificidad del anticuerpo se pudo determinar utilizando el anticuerpo en extractos de proteínas totales de distintos tejidos de la planta (Figura 7A), donde el anticuerpo reconoce una única banda de aproximadamente 100 KDa, tamaño que corresponde al predicho para EPSILON-ADR de *Arabidopsis thaliana*. Con este experimento además, construimos el perfil de acumulación de la proteína EPSILON-ADR, determinándose presencia de ésta en silicuas, lo que coincide con el perfil de expresión, que muestra la más alta acumulación del transcrito en silicuas (Figura 3). Además se observa la proteína en tejidos como flores y plántulas y ausencia de ésta en tallos y hojas maduras (Figura 3)

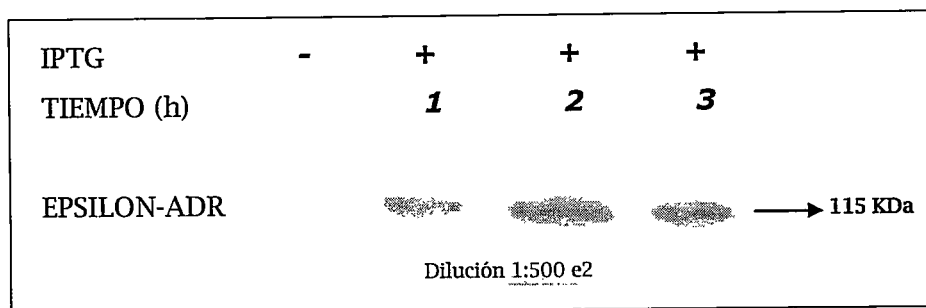


Figura 6. El anticuerpo policlonal contra anti-EPSILON-ADR reconoce a la proteína expresada en un sistema heterólogo. EPSILON-ADR de *Arabidopsis thaliana* fue expresada en bacterias utilizando un sistema heterólogo inducible por IPTG. Las bacterias fueron inducidas por 1, 2 y 3 horas. El western blot utilizando anti EPSILON-ADR usando una dilución 1:500 y anticuerpo secundario anti Rabbit 1:5000. n= 2

3.1.3.2 EPSILON-ADR es una proteína presente en tejidos con alta división celular, asociada a membranas e insensible a BFA

Mediante inmunoblot, se determinó que EPSILON-ADR es una proteína asociada a fracción microsomal (P100) y cuya distribución no es alterada en presencia de BFA (Figura 7B). Con el fin de ver *in situ* la distribución de EPSILON-ADR en raíces de *Arabidopsis*, realizamos inmunolocalizaciones. EPSILON-ADR se acumula de una forma punteada y cortical en células en división (Figura 8) y más bien homogéneamente distribuida por la célula en interfase. Asimismo, esta señal punteada *in situ* tampoco se ve alterada en presencia de BFA (Figura 9), lo que coincide con los resultados obtenidos por Inmunoblot (Figura 7). Estos resultados en conjunto sugieren que esta proteína estaría asociada a membranas intracelulares en plantas.

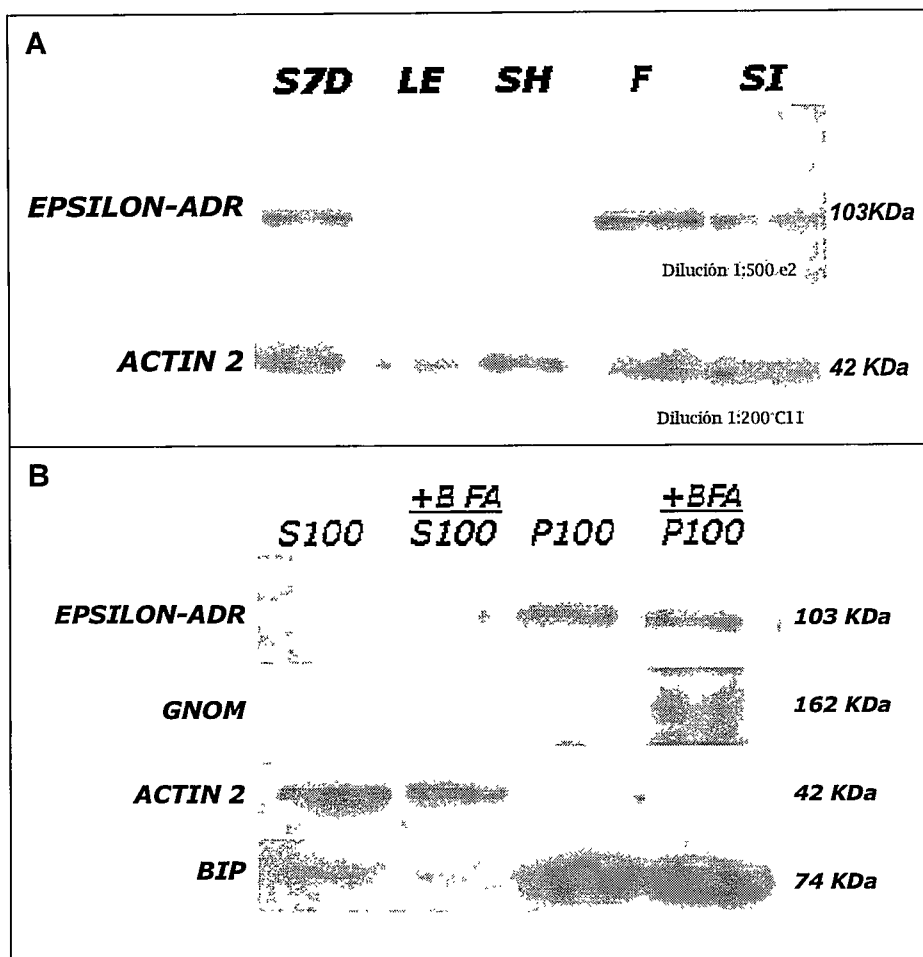


Figura 7. La proteína EPSILON-ADR tiene una distribución tejido específica, está asociada a membranas y su distribución subcelular es insensible a BFA. A. Inmunoblot para detectar EPSILON-ADR en proteínas obtenidas desde distintos tejidos y estados de desarrollo de Arabidopsis. S7D, plántulas de 7 días. LE, hojas. SH, tallo. FL, flores. SI, silicuas. Actina se usó como control de carga. Anti-EPSILON-ADR se usó a una dilución de 1:500 y anti actina a una dilución de 1:200. **B.** Inmunoblot para detectar EPSILON-ADR (la dilución del anticuerpo es de 1:500) en proteínas obtenidas desde plantas tratadas con BFA 100uM por 1h y plantas controles. Se obtuvieron fracciones microsomales crudas (P100) y fracciones solubles (S100). Como control del tratamiento con BFA se usó GNOM (la dilución del anticuerpo es de 1:200), el que se acumula en P100 en presencia de BFA. Fracción soluble y P100 se controlaron con actina (la dilución del anticuerpo es de 1:200) y BIP (la dilución del anticuerpo es de 1:400) respectivamente. n= 2

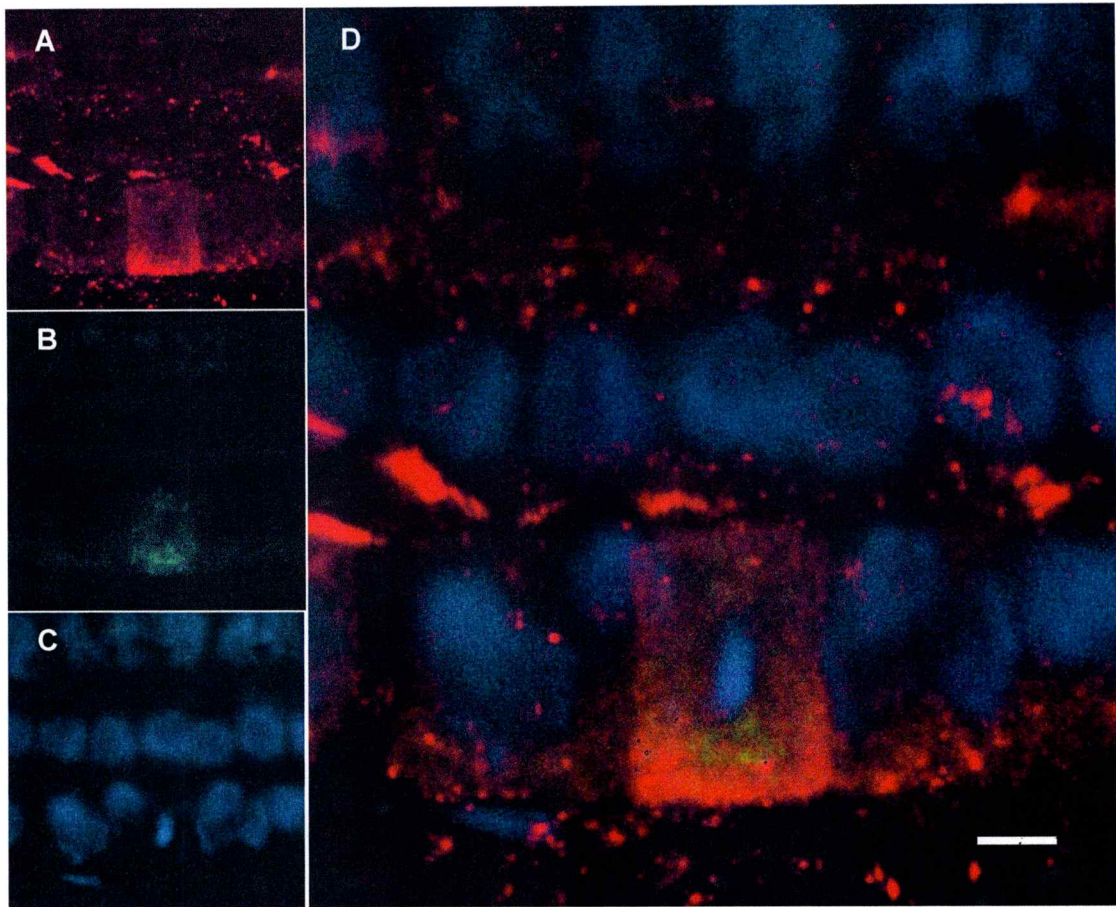


Figura 8. EPSILON-ADR se acumula durante la división celular en raíces de *Arabidopsis thaliana*. Immunolocalizaciones en raíces de *Arabidopsis thaliana*. **A**, Anticuerpo anti EPSILON-ADR. **B**, Anticuerpo anti KNOLLE. **C**, Tinción nuclear con DAPI. **D**, Imagen combinada de **A-C**. La barra representa 5 μ m. n= 10

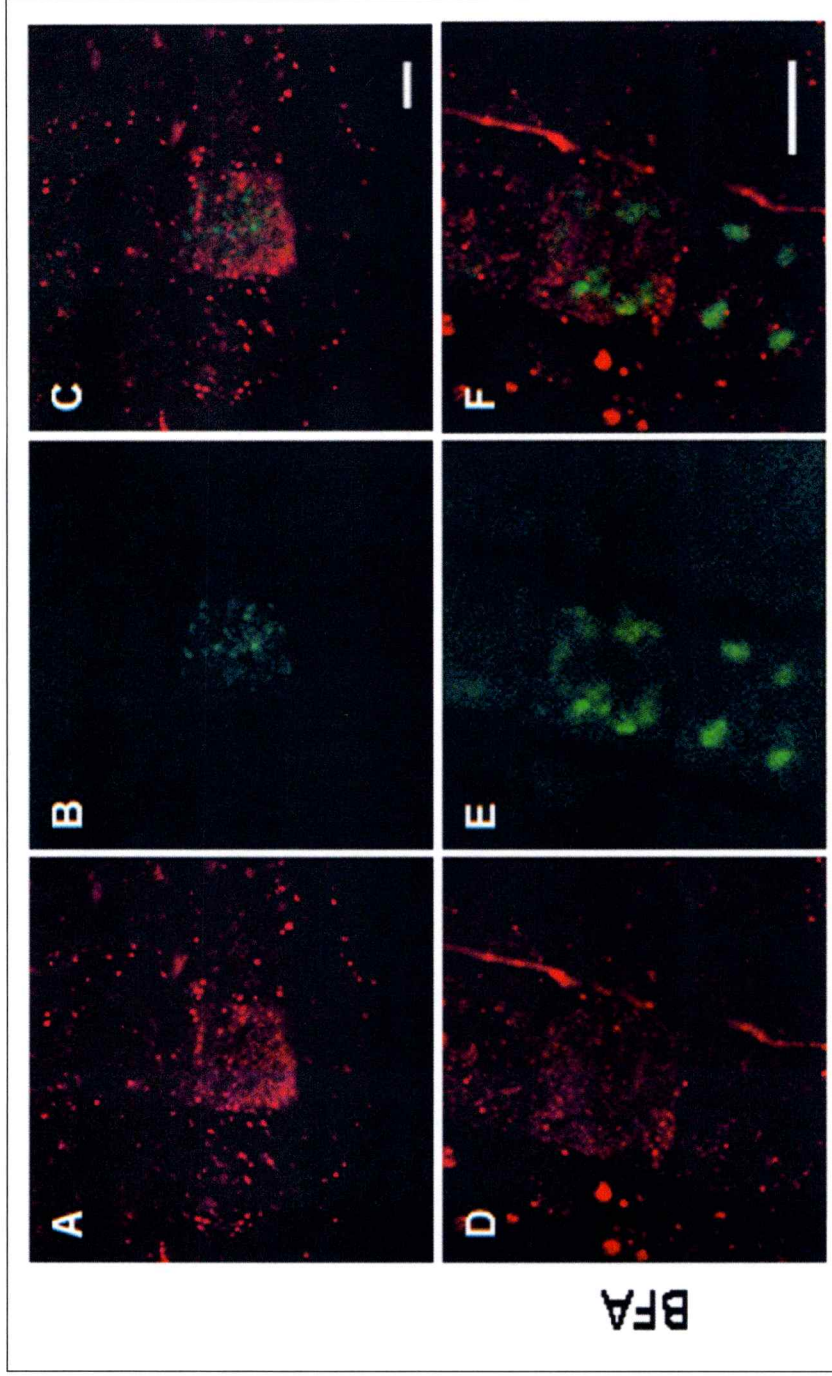


Figura 9. Anticuerpo contra EPSILON-ADR genera un patrón punteado en células del meristema de la raíz, que no se ve alterado en presencia de BFA. A y D. Señal punteada de anticuerpo contra EPSILON-ADR (Rojo). B y E. Señal de anticuerpo contra sintaxina KNOLLE, marcador de división celular y TGN (Verde). C y F, señales combinadas de EPSILON-ADR y KNOLLE. D-F, muestra señal de EPSILON-ADR y KNOLLE en plantas pre-tratadas por 1 hora con BFA 100 μ g/ml. Las barras representan 10 μ m. n= 10

3.1.3.3 EPSILON-ADR es una proteína acumulada principalmente en caliptra lateral, epidermis y corteza de raíces de *Arabidopsis thaliana*

Mediante inmunolocalizaciones en raíces, quisimos caracterizar la distribución tejido o célula específica de EPSILON-ADR. La Figura 10 muestra que la señal del anticuerpo anti EPSILON-ADR no está presente en todos los tipos celulares de la raíz primaria, observándose solamente en células de la caliptra lateral, epidermis y corteza. Estos resultados sugieren que EPSILON-ADR es una proteína tejido específico.

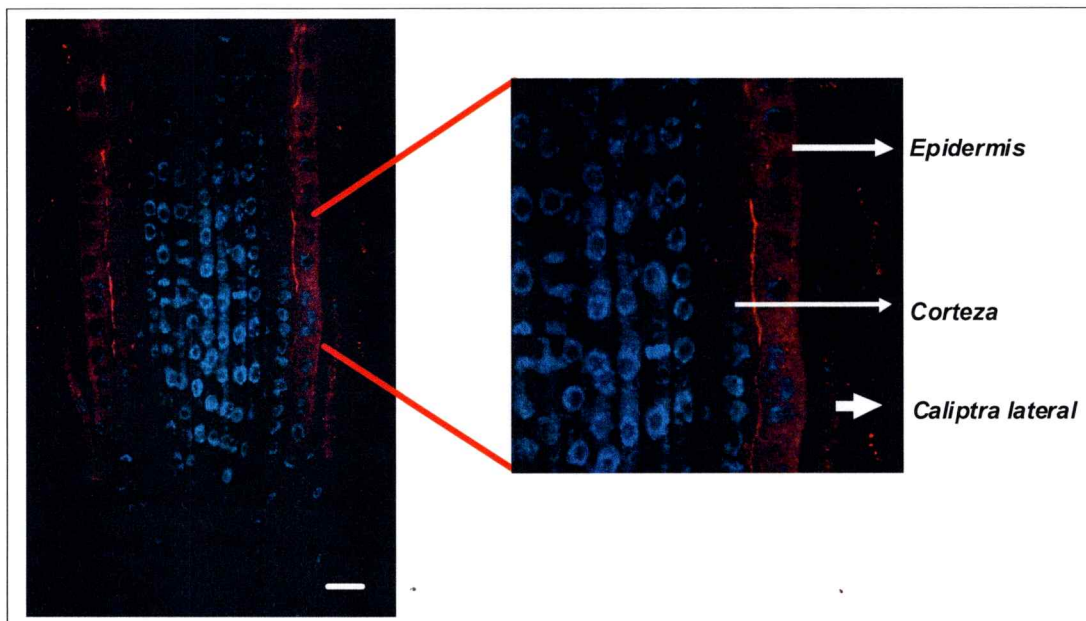


Figura 10. EPSILON-ADR se distribuye preferencialmente en células de la caliptra lateral, epidermis y corteza en raíces de *Arabidopsis thaliana*. Inmunolocalización en raíces de *Arabidopsis thaliana*, utilizando anticuerpos policlonal purificado por afinidad contra EPSILON-ADR (rojo) y DAPI (azul). Imagen representativa de al menos 20 plantas. Barra de tamaño representa 50 μm .

3.1.3.4 EPSILON-ADR está asociada a organelos o cuerpos intracelulares no caracterizados

Para investigar la identidad de los organelos en las que se localiza EPSILON-ADR, se realizaron co-inmunolocalizaciones. EPSILON-ADR no colocalizó con marcadores de retículo endoplasmático [(Haseloff y cols. 1997). Figura 11A], Golgi [NAG y N-ST (Reichardt y cols. 2007). Figura 11B-C], TGN [Ai y KN (Dhonukshe y cols. 2006). Figura 11D-E], PVC y vacuola lítica [ALEU (Feraru y cols. 2010). Figura 11F] ni endosomas [SNX1 (Pourcher y cols. 2010), GNOM-BFA (Geldner y cols. 2003) y ARA6 (Dhonukshe y cols. 2006; Ueda y cols. 2001), Figura 11G-I], sugiriendo que EPSILON-ADR se asocia a estructuras intracelulares no caracterizados.

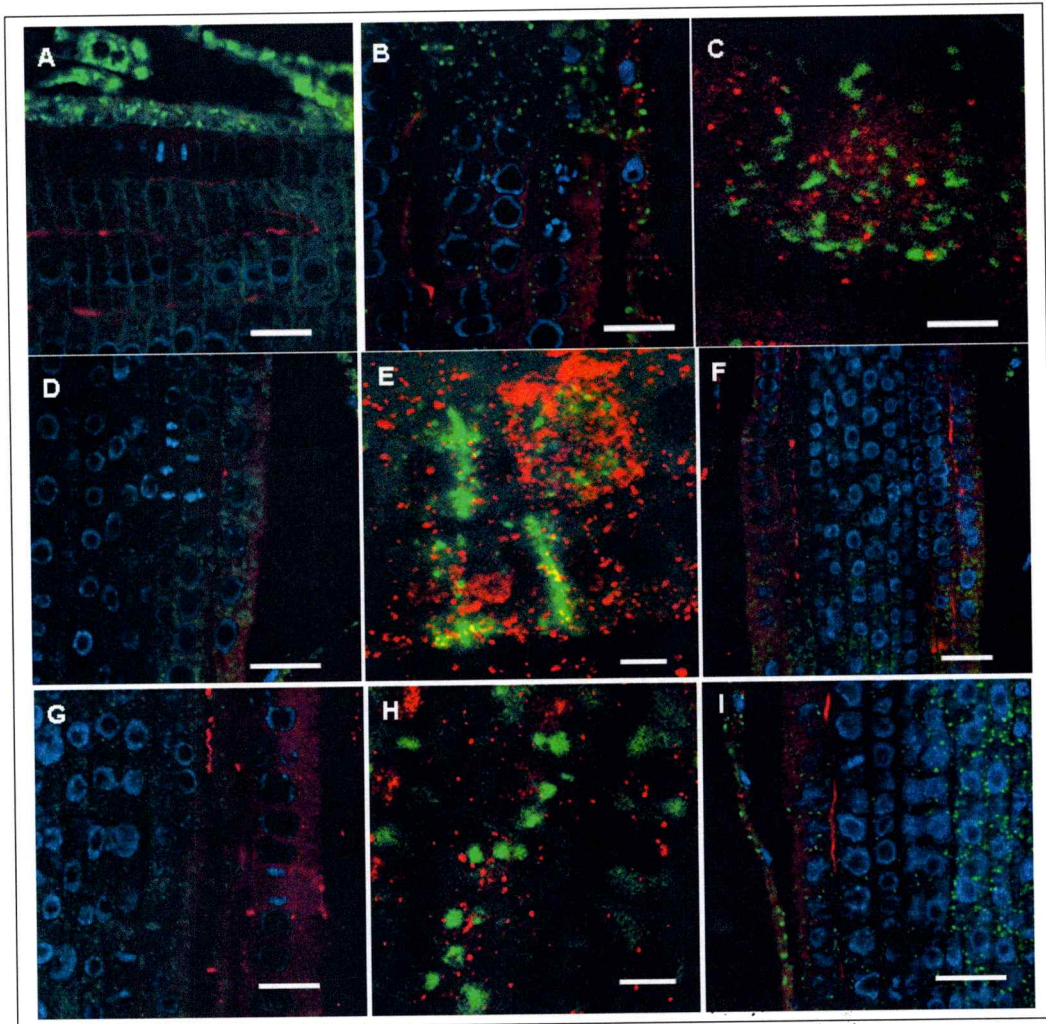


Figura 11. EPSILON-ADR reside en organelos de identidad no caracterizada. Inmunolocalizaciones utilizando marcadores fluorescentes de organelos (GFP) y anti EPSILON-ADR (Rojo), DAPI en azul. **A.** Retículo endoplasmático (KDL_GFP). **B y C,** Golgi (NAG y N-ST). **D y E,** TGN (Ai y KNOLLE). **F,** PVC y/o vacuola lítica (ALEU). **G-I,** endosomas (SNX1, GNOM-BFA y ARA6). Barras en A, B, D, F, G e I representa 10 µm y en C, E y H representan 5 µm. n= 3 plantas

3.1.3.5 ¿EPSILON-ADR forma parte de un complejo proteico en plantas?

Mediante inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo policlonal purificado por afinidad fue posible purificar una especie proteica que sugiere un complejo de alto peso molecular. La Figura 12, muestra un gel SDS PAGE post precipitación teñido con nitrato de plata, donde es posible distinguir una banda nítida de alto peso molecular en el carril 4 (sobre 200KDa) El gran tamaño de esta banda sugiere que esta especie proteica podría formar parte de un complejo de alto peso molecular o bien que es una proteína insoluble en nuestro buffer de extracción, generando agregados de alto peso molecular. Asimismo, los controles negativos del ensayo no muestran presencia de proteínas, descartándose que esa banda corresponda al anticuerpo no unido (carril 3) y la unión inespecífica de proteínas a la columna se descarta con los controles del carril 1 y 2 que corresponden a resina inerte y a resina sin anticuerpo unido, respectivamente. Pese a esto, estos resultados no son concluyentes respecto a si en esta especie proteica se encuentra nuestra proteína en estudio, lo que hace necesario realizar un inmunoblot de la fracción purificada.

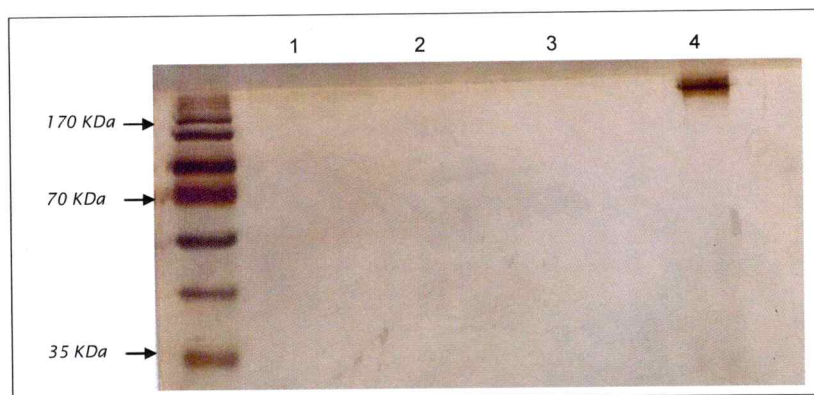


Figura 12. Ensayo de inmuno precipitación utilizando anticuerpo contra EPSILON-ADR muestra una banda de alto peso molecular. SDS-PAGE para resolver las eluciones de las columnas de inmunoprecipitación en buffer no reductor. 1. Columna inactiva incubada con anticuerpos y proteínas totales de Arabidopsis. 2. Columna activada sin anticuerpo incubada con proteínas totales de Arabidopsis. 3. Columna activada con anticuerpo anti EPSILON-ADR acoplado, incubada con buffer de extracción de proteínas. 4. Columna activada, con anticuerpo anti EPSILON-ADR acoplado e incubado con proteínas totales de *Arabidopsis thaliana*.

3.1.4 Genética reversa para el estudio de la función Biológica de EPSILON-ADR en *Arabidopsis thaliana*

Mediante genética reversa es posible acercarse a entender y dilucidar la función fisiológica de un gen en la planta completa. Tanto la pérdida como la ganancia de función y los fenotipos que estas modificaciones genéticas provocan en una planta entregan información clave de los procesos celulares y/o fisiológicos en los que un gen participa.

3.1.4.1 Caracterización genotípica y fenotípica de una mutante Knock-out en EPSILON-ADR

Se han aislados 3 mutantes homocigotos en *EPSILON-ADR* (Tabla 5), de los cuales *eps1.3* presenta ausencia de transcrito y proteína (Figura 13A y B, Tabla 5). Al analizar fenotípicamente la mutante *eps1.3* en heterocigocidad (*eps1.3^{+/-}*), se observaron silicuas menos alongadas (Figura 14 A y D), con disminución

tanto en el número de embriones (Figura 14 B y D) y presencia de embriones abortados (Figura 14 C y D).

Figura 13. (Página siguiente). Mutante *eps1.3* homocigota es nula para la presencia de transcrito y proteína, presenta defectos en el crecimiento de raíz primaria, fenotipo que es exacerbado en ausencia de sacarosa. A. RT-PCR de cADN obtenido a partir de ARN de plántulas silvestres (Col-0) y mutantes (*eps1.3*) de 7 días crecidas en MS suplementado con 1% de sacarosa. Se amplificó un fragmento de 500 pb del CDS de *EPSILON-ADR* (superior) y como control de carga se amplificó un fragmento de 200 pb del gen actina 2 (inferior). B. Western blot que muestra la presencia de la proteína *EPSILON-ADR* en extractos de proteínas totales de plántulas silvestres (Col-0) y mutantes (*eps1.3*) de 7 días crecidas en MS suplementado con 1% de sacarosa. Utilizando anti *EPSILON-ADR* de *Arabidopsis thaliana*, es posible distinguir una banda de aproximadamente 103 KDa (superior). Membrana de transferencia teñida con rojo de Ponceau, como control de carga de proteínas (inferior). C y D. Plantas de 7 días crecidas en 30mM de sacarosa, (C) y en ausencia de sacarosa (D). E y F. Plantas de 10 días crecidas en 30mM de sacarosa (E) y ausencia de sacarosa (F). G y H. Análisis cuantitativo del largo de la raíz primaria de plantas de 7 días crecidas ausencia (G) y en 30 mM de sacarosa (H). Las Barras representan la media con su respectivo error estándar. Experimentos realizados con n mayor a 60 plantas por experimento. La significancia estadística se determinó mediante análisis de t de student. $p < 0,001$

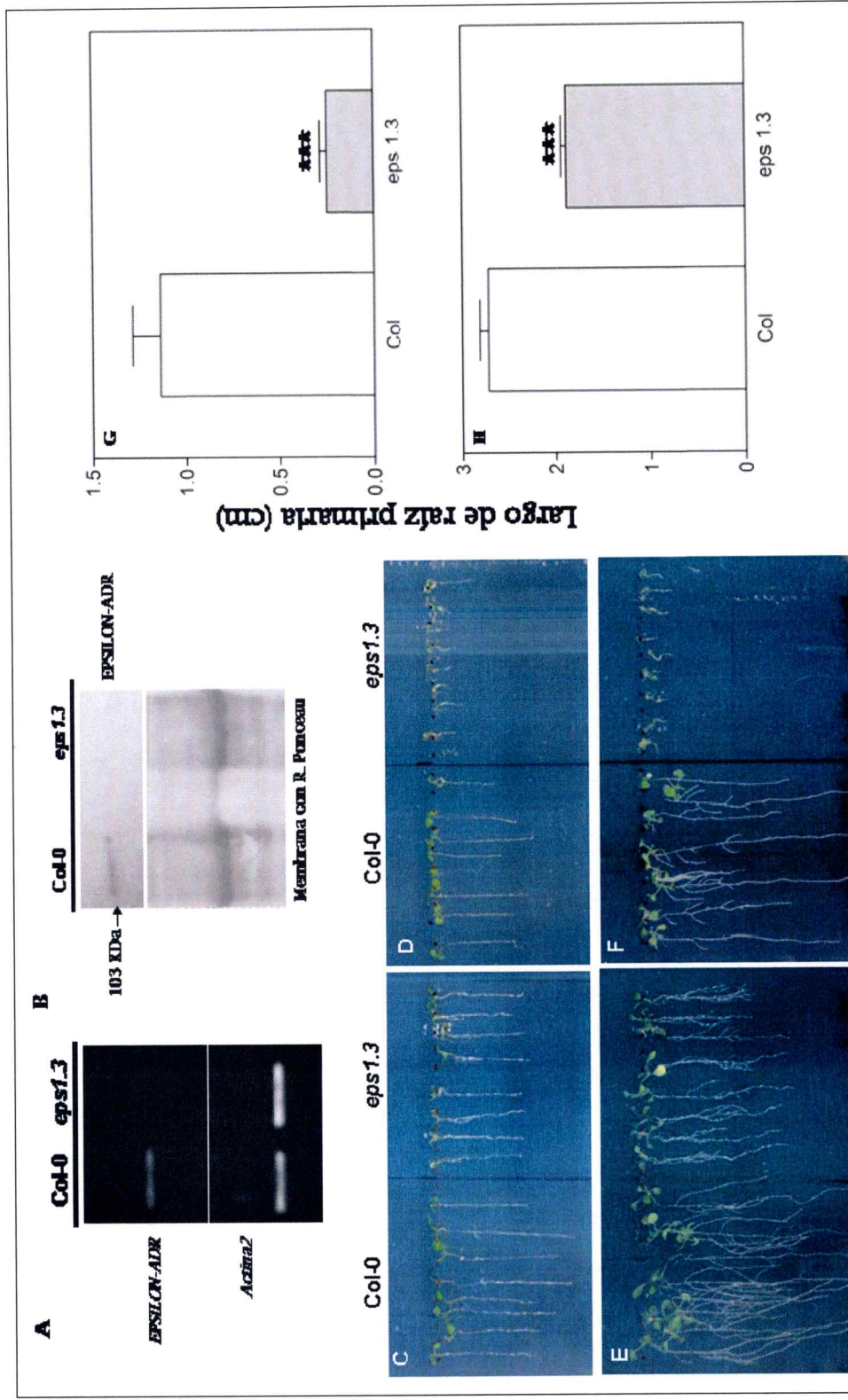


Figura 13. Leyenda en la página anterior

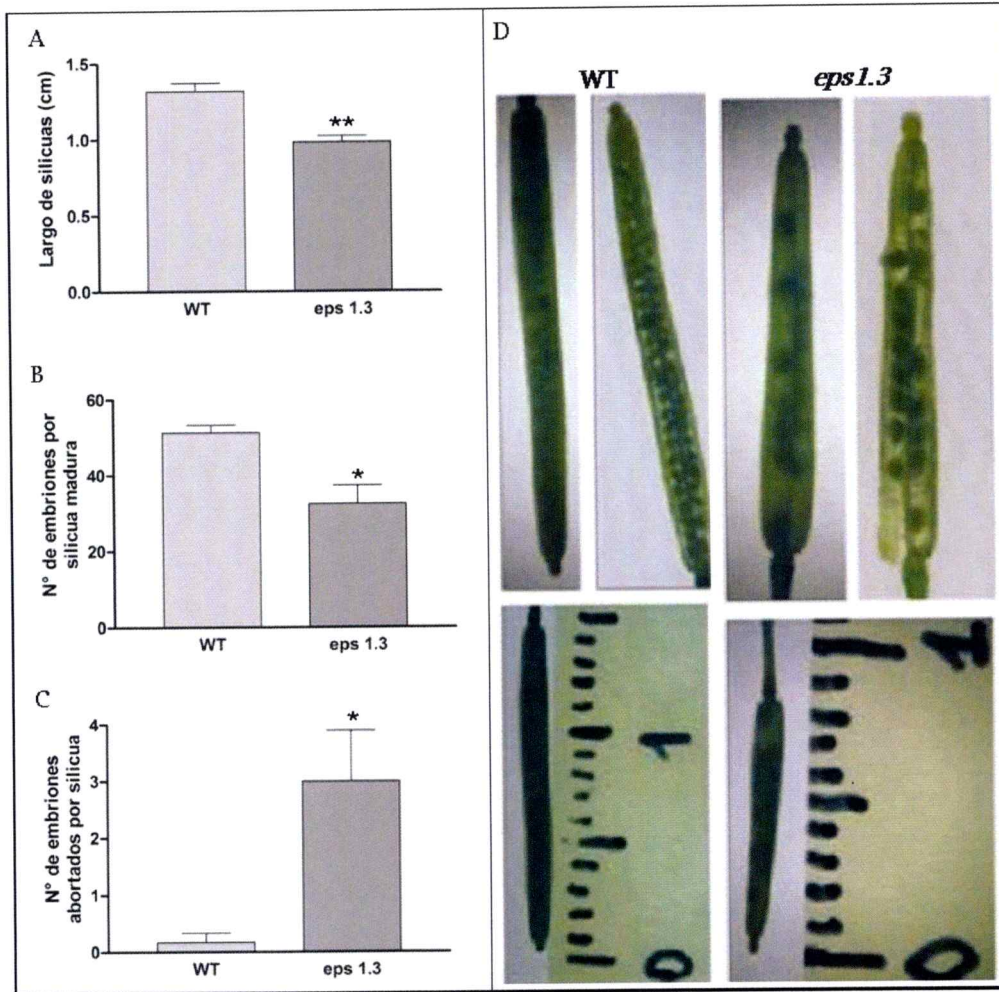


Figura 14. Mutante insercional *eps1.3*^{+/−} presenta defectos en silicuas y embriones. A-C, análisis cuantitativo de fenotipos en silicuas en mutantes *eps1.3*^{+/−}: largo de silicuas (A), n° de embriones por silicua (B) y embriones abortados (C). n=6. **D,** fotografías de silicuas de plantas WT y mutantes heterocigotos. Se analizaron silicuas maduras antes de la desecación. La regla muestra 1 cm y subdivisiones de 1 mm. Las diferencias significativas fueron establecidas mediante análisis de t student ($p < 0,05$). * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$. n= 6

En homocigidad, la planta presenta fenotipos alterados que fueron cuantitativa (Figura 13 G y H) y cualitativamente analizados (Figura 13 C-F y Figura 15). La planta completa presenta disminución de tamaño, es decir, rosetas mas pequeñas (Figura 15, abajo), pérdida de dominancia apical, es

decir, numerosas inflorescencias poco alongadas y silicuas muy pequeñas (Figura 15, arriba) Estos resultados sugieren que la ausencia de la proteína EPSILON-ADR en *Arabidopsis thaliana*, genera defectos a nivel de desarrollo embrionario y tamaño de órganos, lo que puede asociarse a procesos celulares como división o elongación celular, así como también, a diferenciación celular (presencia o ausencia de tipos celulares y/o número de células)

Finalmente hemos observado, que esta mutante presenta defectos exacerbados de disminución de largo de las raíces primarias cuando son germinadas en ausencia de sacarosa en el medio (Figura 13 C-H). Para determinar si este fenotipo es debido a defectos de acumulación de azúcares en las semillas, se midió el contenido total de glucosa en semillas y se comparó dicho contenido entre plantas Col-0 y *eps1.3* homocigotas. La Figura 16 muestra que *eps1.3* presenta menor contenido de glucosa total sugiriendo que estas mutantes presentan un defecto en el almacenamiento de carbohidratos durante embriogénesis y/o durante la desecación del embrión maduro, sugiriendo que esta característica en la mutante sería un potencial responsable directo o indirecto de los defectos en la germinación y el crecimiento observados en esta planta.

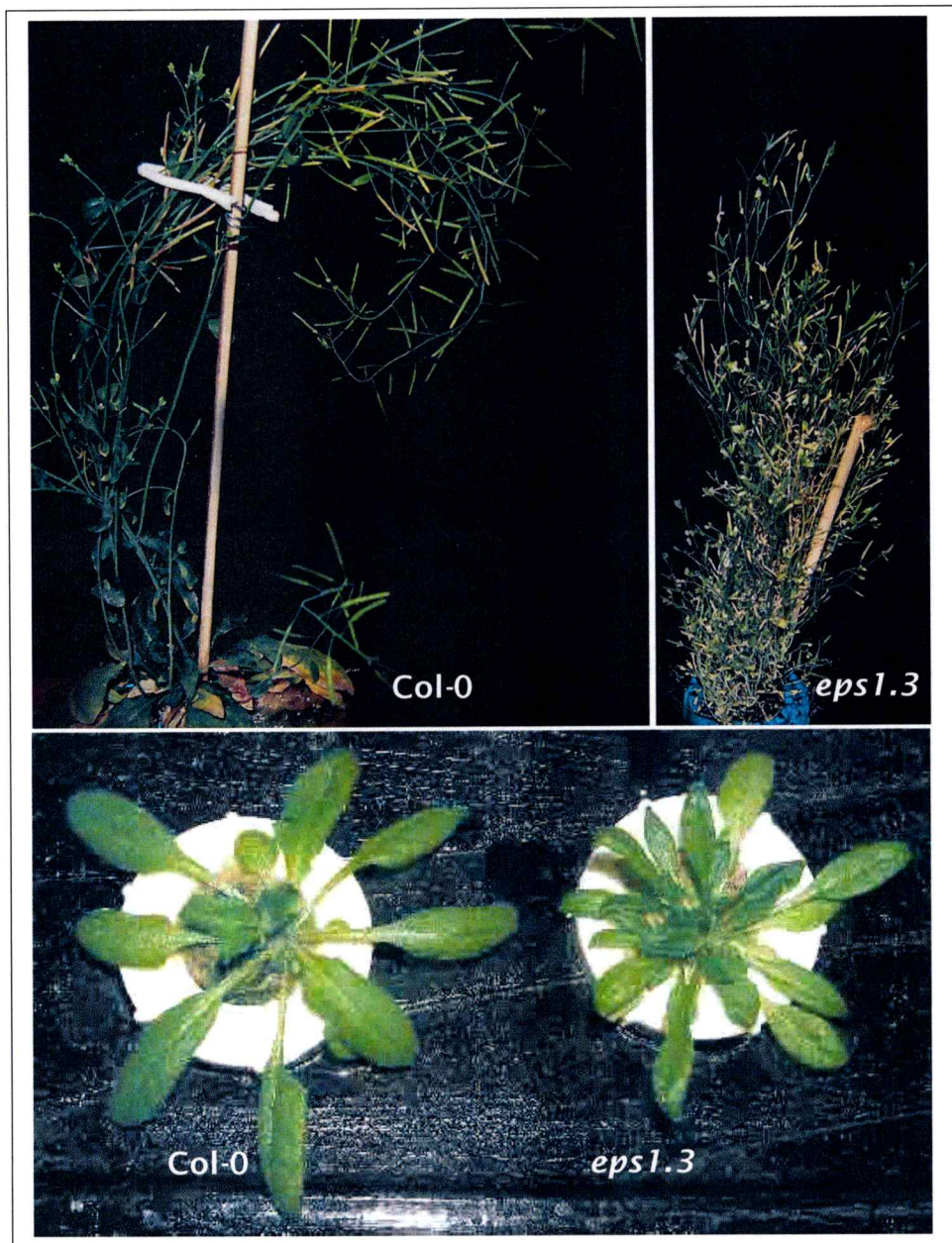


Figura 15. *eps1.3* homocigota, presenta reducción en el tamaño de órganos aéreos. Fotografías representativas que muestran diferencias en inflorescencia y silicuas en plantas de 2 meses (arriba) y roseta de 3 semanas (abajo).

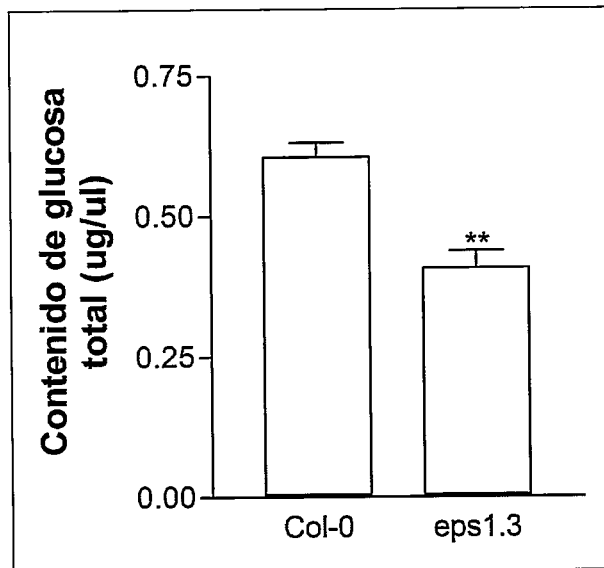


Figura 16. Contenido total de glucosa en semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *eps1.3* homocigotas, sugiere defectos en almacenamiento de carbohidratos en semillas. Se obtuvo extracto de glucosa total desde 100 mg de semillas desecadas de *Arabidopsis* Col-0 y *eps1.3*. Contenido total de glucosa fue estimado usando absorbancia de 340nm. Las barras representan el promedio de tres replicas biológicas con su respectivo error estándar. Se realizó análisis estadístico t student ($p < 0,01$), confirmando diferencias estadísticamente significativas.

3.1.5 EPSILON-ADR está conservado entre plantas y vertebrados en secuencias y posible función.

Buscamos las posibles secuencias ortólogas a *EPSILON-ADR* en los genomas disponibles en las bases de datos públicas. Sólo encontramos estas secuencias en los genomas de vertebrados y ausencia en modelos como *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* y *C. elegans*. Además buscando en los genomas de plantas secuenciados y disponibles públicamente, fuimos capaces de encontrar la secuencia en todos los sistemas vegetales analizados incluso en algas y hongos parásitos de vegetales. En la Figura 17 se presenta un dendograma, con el análisis filogenético de *EPSILON-ADR* en distintos sistemas eucariontes. Como outgroup se usó *GAMMA-ADR* de distintos sistemas eucariontes. Un

segundo análisis fue buscar en los putativos promotores de los ortólogos de EPSILON-ADR, elementos en CIS tipo MSA, activadores de mitosis. Sorprendentemente todas las secuencias río arriba de los genes para EPSILON-ADR de vertebrados y plantas analizados, excepto maíz, presentan una o más copias de este tipo de elementos CIS (Tabla 6). Sin embargo, Alamo, presenta un consenso para factores de transcripción tipo MYB2, similar al presente en ameba.

Estos resultados sugieren una posible conservación de función durante la división celular de esta adaptina en sistemas tan diversos como peces y algas (Tabla 6).

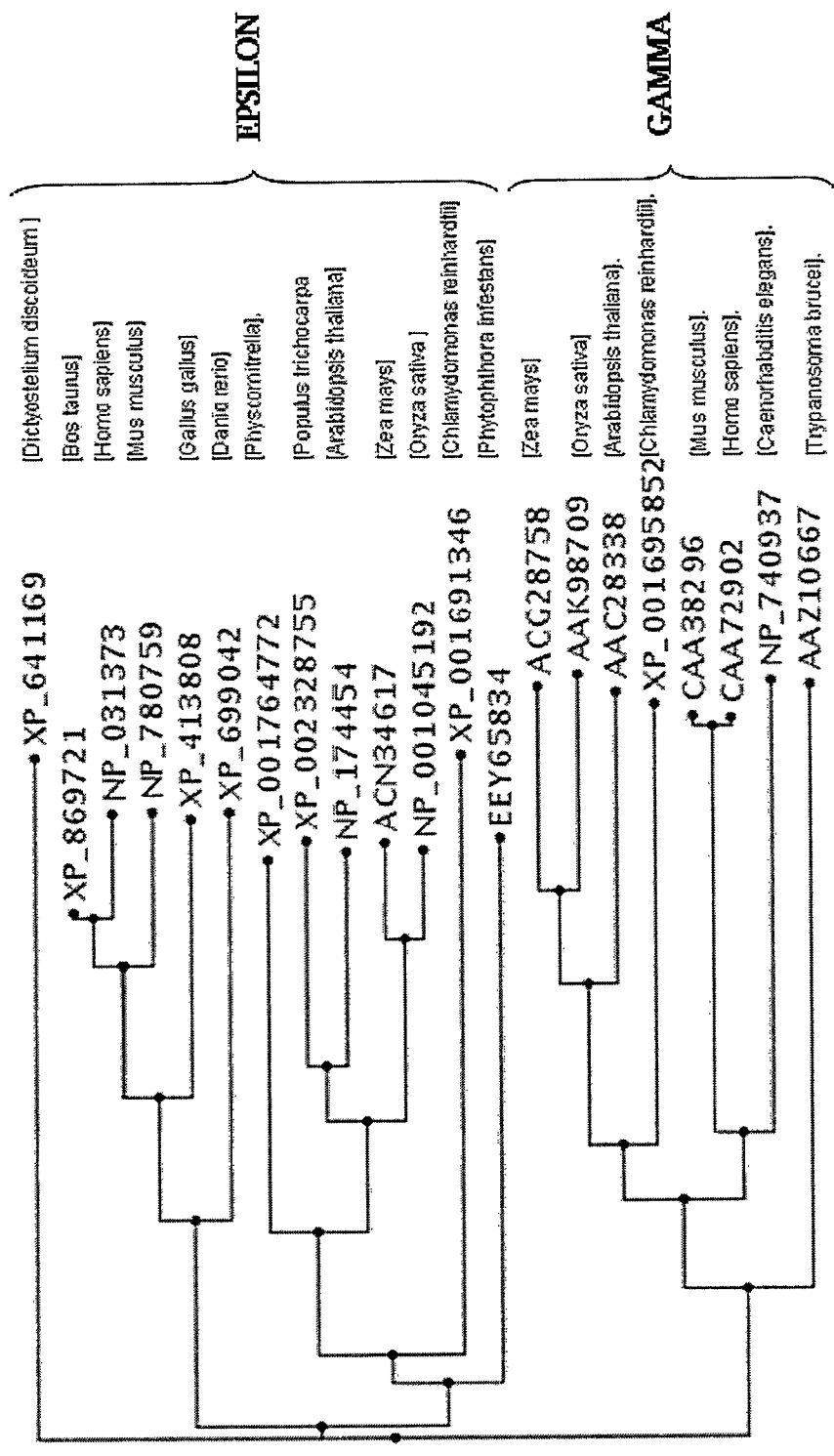


Figura 17 EPSILON-ADR es una proteína conservada sólo entre vertebrados y plantas. Dendrograma que muestra la cercanía filogenética entre EPSILON-ADR de plantas y vertebrados. Como outgroup se usó la secuencia de Proteína tipo Adaptina descrita en el genoma de Protistas (*Dictyostelium discoideum*). EPSILON-ADR y GAMMA-ADR se asocian en grupos distintos

Tabla 6. Promotores de ortólogos de EPSILON-ADR en vertebrados y plantas presentan elementos CIS que responden a división celular. Se tomaron 1000pb río arriba del inicio de la traducción y se analizaron mediante PLACE. Como control negativo se incorporó al análisis la secuencia relacionada con adaptina presente en el genoma de *Dicotylestium discoideum*

Especie	Gi	Nombre del elemento	Secuencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	xp_001691346	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	xp_001691346	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	xp_001691346	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Danio rerio</i>	xp_699042	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Mus musculus</i>	np_780759	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Homo sapiens</i>	np_031373	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Homo sapiens</i>	np_031373	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Gallus gallus</i>	XP_413808	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Gallus gallus</i>	XP_413808	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Gallus gallus</i>	XP_413808	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Zea mays</i>	ACN34617	ND	
<i>Oryza sativa</i>	NP_001045192	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Oryza sativa</i>	NP_001045192	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_641169	MYB2CONSENSUSAT	YAACKG
<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_641169	MYB2CONSENSUSAT	YAACKG
<i>Bos taurus</i>	XP_869721	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Phytophthora infestans</i>	EY65834	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Phytophthora infestans</i>	EY65834	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Phytophthora infestans</i>	EY65834	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Phytophthora infestans</i>	EY65834	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Phytophthora infestans</i>	EY65834	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Phytophthora infestans</i>	EY65834	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_174454	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002328755	MYB2CONSENSUSAT	YAACKG
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002328755	MYB2CONSENSUSAT	YAACKG
<i>Physcomitrella</i>	XP_001764772	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Physcomitrella</i>	XP_001764773	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Physcomitrella</i>	XP_001764774	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Physcomitrella</i>	XP_001764775	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Physcomitrella</i>	XP_001764776	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Physcomitrella</i>	XP_001764777	MYBCOREATCYCBI	AACGG
<i>Physcomitrella</i>	XP_001764778	MYBCOREATCYCBI	AACGG

3.2 Capítulo II: GAMMA-ADRs y su rol biológico en plantas

3.2.1 Plantas RNAi contra GAMMA-ADRs de *Arabidopsis thaliana*

En el genoma de *Arabidopsis* existen tres loci que codifican para proteínas tipo GAMMA-ADR. Nosotros diseñamos una estrategia de ARN de interferencia (RNAi) que nos permitiera silenciar los tres loci simultáneamente. Así, generamos plantas transgénicas con niveles disminuidos de expresión de las tres GAMMA-ADRs (Figura 18A). Análisis de PCR semi cuantitativo muestran que GAMMAI-ADR y GAMMAIII-ADR son los transcritos mas afectados por la construcción de RNAi (Figura 18A).

3.2.2 GAMMA-ADRs participan en el desarrollo y crecimiento de órganos en *Arabidopsis thaliana*

Análisis fenotípicos de dos líneas independientes de plantas RNAi para GAMMA-ADRs homocigotos (3A7B y 3E6t) mostraron defectos en el tamaño de los órganos y de la planta completa (Figura 19A-C) A su vez, estas plantas mostraron pérdida de la dominancia radicular, es decir, aparición temprana de raíces laterales, acompañado con la disminución del tamaño de la raíz primaria (Figura 19A y 20).

Paralelamente hemos aislado y caracterizado genóticamente plantas mutantes nulas para cada uno de los tres loci de GAMMA-ADRs (Tabla 5). El análisis fenotípico de una de las mutantes nulas para GAMMAIII-ADR (*gamm3-*

6, Figura 18B y 20B) mostró aumento en el número de raíces laterales al igual que la mutantes RNAi (Figura 20). Este fenotipo coincide con la dramática disminución de *GAMMAIII-ADR* en las mutantes RNAi (Figura 18A) y ausencia total del transcrito para *GAMMAIII* en la mutante nula *gam3-6* (Figura 18B)

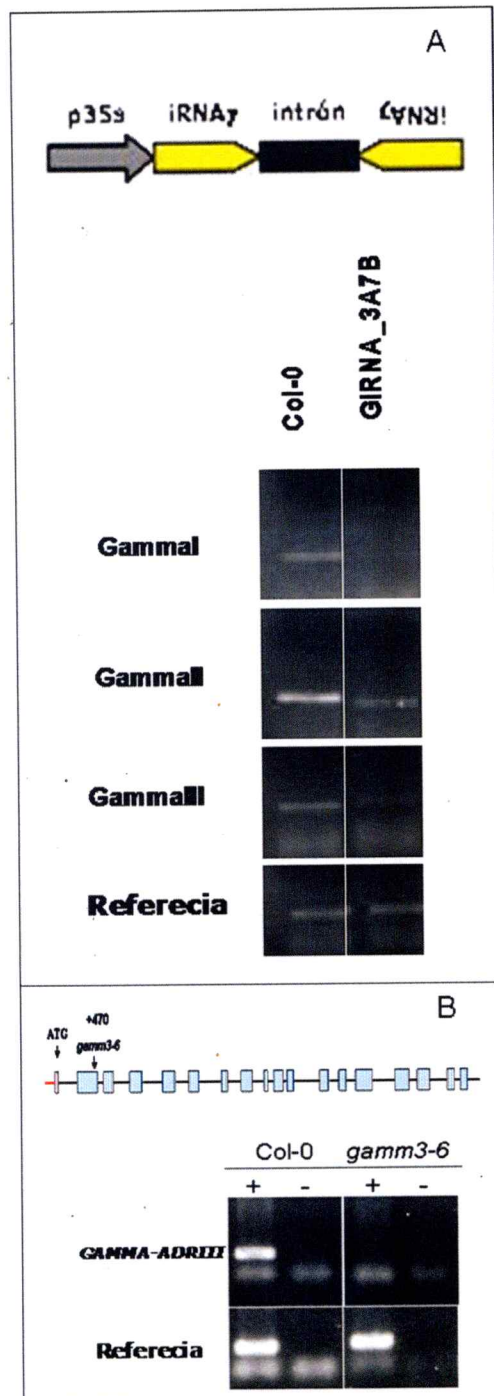


Figura 18. Análisis de expresión de mutantes en GAMMA-ADR. A. PCR semi cuantitativo para GAMMA I, II y III de cADN derivado de mutantes RNAi (3A7B) y plantas silvestres, Col-0. B. Locus de GAMMAIII-ADR y esquema de la posición de la inserción en el locus del gen. Abajo, PCR desde cADN derivado de plantas silvestres ecotipo Col-0 y mutante *gamm3-6*. Actina 2 fue usado como gen de referencia.



Figura 19. Disminución de la expresión de GAMMA-ADR genera disminución en el tamaño de órganos en la planta. Análisis fenotípico de dos líneas independientes mutantes RNAi. A. Largo de raíces primarias de plantas de 2, 4 y 7 días crecidas verticalmente. n de al menos 50 plantas. B. Área de cotiledones de plantas de 7 días crecidas horizontalmente. n de al menos 50 plantas. C. Plantas adultas de 8 semanas crecidas en medio hidropónico. Diferencias estadísticamente determinadas mediante (ANOVA $p < 0.05$) Tukey, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y * = $p < 0.001$**

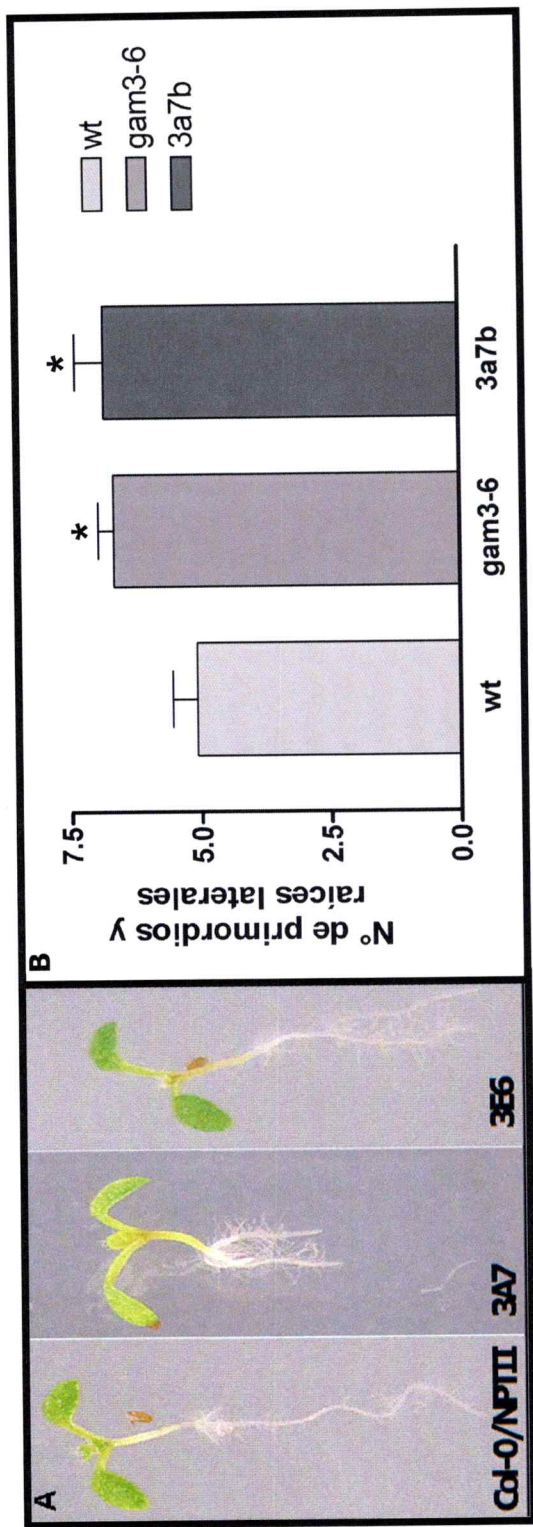


Figura 20. Disminución y/o ausencia de GAMMA-ADR provoca aumento en el número de raíces laterales en plantas. **A.** Líneas RNAi contra GAMMA-ADR presentan pérdida de dominancia radicular en presencia de Kanamicina. Plantas de 10 días de dos líneas transgénicas independientes comparadas con plantas Kanamicina resistentes. **B.** Plantas mutantes RNAi y *gam3-6* de 7 días germinadas en 1% de sacarosa, se cuantificó el número de primordios y raíces laterales. n de 30 plantas. Diferencias estadísticamente significativas determinadas por (ANOVA $p < 0,05$) Tukey test. $P < 0,05$.

3.2.3 GAMMA-ADRs *participarían en el tráfico de la proteína KNOLLE en raíces de Arabidopsis thaliana*

A nivel celular esta descrito por el grupo de Hwang (Song y cols. 2006), que GAMMAI-ADR participaría en el transporte hacia la vacuola. Este antecedente nos llevó a mirar el tráfico de la proteína KNOLLE, la cual es transportada desde TGN a la vacuola vía MVB, una vez terminada la división celular (Reichardt y cols. 2007). En dos líneas independientes de mutantes RNAi estimamos cualitativamente que KNOLLE está mayormente acumulada en células post división celular (Figura 21A-C). Asimismo, la mutante nula para GAMMAIII-ADR presenta aumento en el contenido total de la proteína KNOLLE respecto a las plantas silvestres (Figura 21D). Estos resultados sugieren que GAMMAIII estaría participando en el tráfico de KNOLLE hacia la vacuola una vez finalizada la división celular.

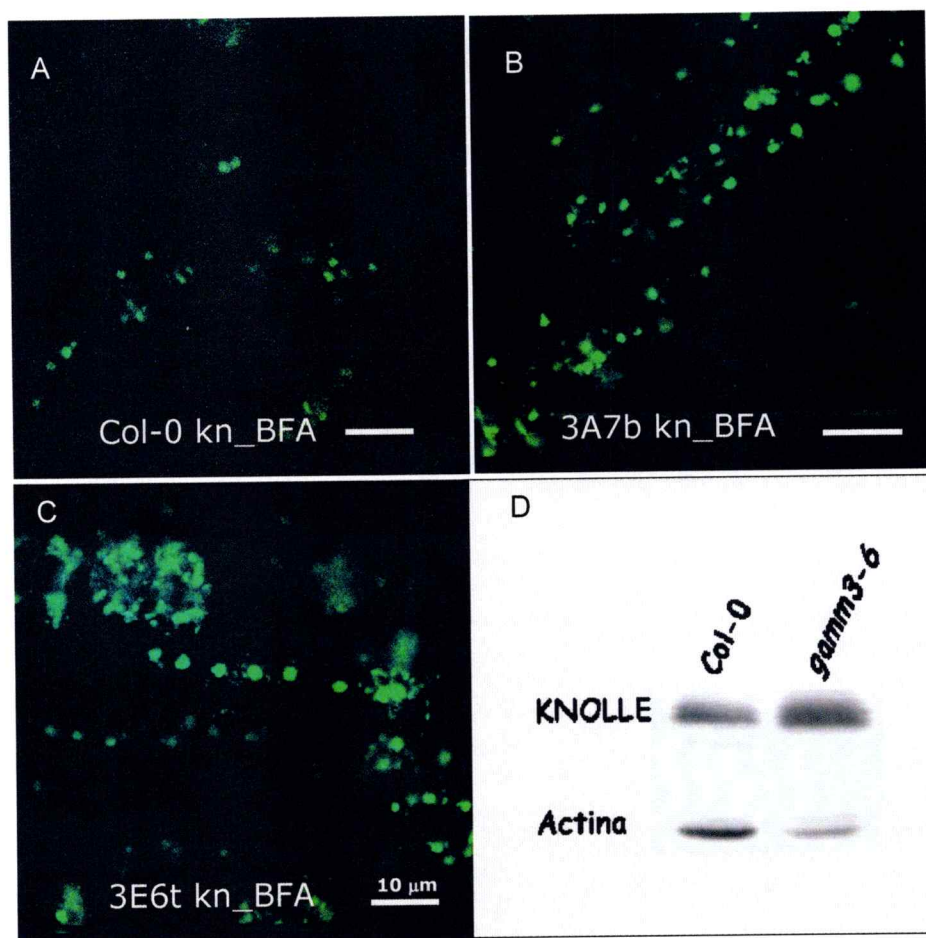


Figura 21. Disminución o ausencia de GAMMA-ADRs en plantas genera posibles defectos en el tráfico hacia la vacuola. Proteína KNOLLE se sobre acumula en mutantes contra GAMMA-ADR. A-C. Inmunolocalizaciones contra KNOLLE en células de la raíz, en plantas pretratadas con BFA 100uM por 1 h n= 6. Plantas Col-0 (A) y mutantes RNAi 3A7b (B), 3E6t (C). D. Inmunoblot detecta mayor acumulación de KNOLLE en mutante *gamm3-6* n= 2. Barra de tamaño representa 10 μm.

3.2.4 *Gammal-ADR se distribuye punteadamente en células de la raíz de Arabidopsis*

Para analizar la distribución subcelular de GAMMA-ADRs, diseñamos y caracterizamos un anticuerpo policlonal capaz de reconocer las tres proteínas simultáneamente, sin embargo este anticuerpo resultó presentar una baja

especificidad, reconociendo un sin número de proteínas. Por lo cual tomamos la estrategia de obtener plantas transgénicas con GAMMA-ADR fusionadas con la proteína GFP bajo un promotor constitutivo. Al analizar las plantas para GAMMAI-GFP, no logramos visualizar fluorescencia de GFP, sin embargo los análisis de transcrito mostraban aumento en GAMMAI-ADR y presencia de GFP (Figura 22A). Por ello realizamos inmunolocalizaciones contra GFP. En la Figura 22B se muestra el patrón de distribución de GAMMAI. Este patrón punteado y homogéneamente distribuido en células de la raíz. Además, determinamos que este patrón punteado no cambia en plantas pretratadas con BFA, sugiriendo que la distribución de GAMMAI-ADR es insensible a BFA al igual que el patrón de EPSILON-ADR.

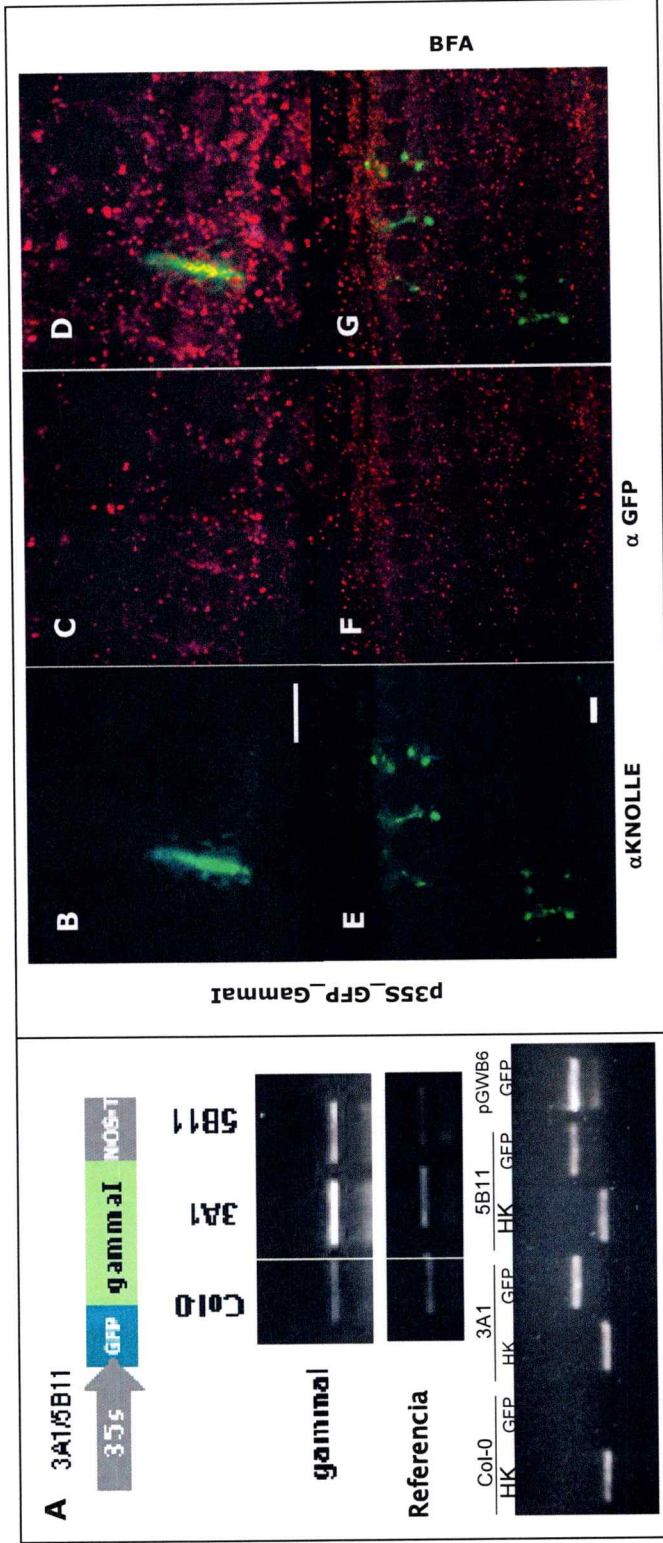


Figura 22. GAMMA1-ADR se distribuye punteada y homogéneamente en células de la raíz. A. GAMMA1-ADR fusionada con GFP en el amino terminal se expresa en plantas transgénicas. PCR para detectar GAMMA1 (arriba) y GFP (abajo) desde cADN derivado de plantas transgénicas que sobreexpresan GFP-GAMMA1 (3A1 y 5B11) y desde plantas silvestres (Col-0). Como gen de referencia se usó Actina 2. B-G, Immunolocalizaciones en plantas transgénicas GFP-GAMMA1 usando anti GFP (rojo, C y F) y anti KNOLLE (verde, B y E). D y G son las imágenes combinadas. E-G, plantas pretratadas con BFA 100 μ M por 1 h. La barra de tamaño representa 10 μ m.

4 Discusión

4.1 La función biológica de EPSILON-ADR está asociada al ciclo celular

Durante este estudio se abordó el posible rol de EPSILON-ADR en la división celular en plantas. Fuimos capaces de mostrar, mediante análisis de expresión, durante la progresión de ciclo celular, que *EPSILON-ADR* de *Arabidopsis thaliana* es regulado durante este proceso, alcanzando el máximo de expresión a las ocho horas de la progresión del ciclo celular, tiempo que coincide con el máximo índice de mitosis reportado en varios trabajos que utilizan esta misma técnica para sincronizar el ciclo celular en cultivos de células en suspensión de plantas (Ito y cols. 1998; Zhang y cols. 2005), Adicionalmente, este máximo coincide con el peak de expresión de genes caracterizados como exclusivos de la división celular como *KNOLLE* (Haga y cols. 2007). Este gen posee elementos MSA en su secuencia promotora al igual que *EPSILON-ADR*. Interesantemente, durante la progresión del ciclo celular los mínimos de expresión de *EPSILON-ADR* son al tiempo cero y luego a las 24 h. Estos tiempos coinciden con los que se registran en el proceso de síntesis de ADN (Ito y cols. 1997) Estos resultados nos sugieren que *EPSILON-ADR* tiene un perfil de expresión durante el ciclo celular, caracterizado por la represión durante la fase de síntesis de ADN e inducido alcanzando el máximo de

expresión en la fase de mitosis [a las 8 h. post tratamiento con afidicolina (Ito y cols. 1997)].

Paralelamente, quisimos determinar si la transcripción de *EPSILON-ADR* era regulada por inductores de división celular en plantas, por lo cual determinamos los niveles relativos de transcritos en plantas pretratadas con sacarosa y citoquinina. La ausencia de sacarosa en cultivos celulares provoca detención de la progresión del ciclo celular en fase G1, por lo que es un compuesto esencial para la correcta progresión del ciclo celular (Hirano y cols. 2008; Hirano y cols. 2011). Además, se ha demostrado que en meristemas la concentración de glucosa es alta (Borisjuk 1998), sugiriendo que este compuesto es necesario para la proliferación celular.

Citoquinina es una hormona vegetal sintetizada en los meristemas capaz de inducir la división celular en plantas, así como también promueve la diferenciación celular en algunos tejidos. Nuestros resultados demuestran que tanto citoquinina como sacarosa son capaces de inducir la expresión de *EPSILON-ADR* y de genes activados durante división celular como *CYCB1;1* (Ito 2000). Todos estos antecedentes son fuerte evidencias de que *EPSILON-ADR* es inducido durante división celular en plantas.

Se ha demostrado que durante el proceso de división celular en plantas hay una alta tasa de síntesis de novo de proteínas (Reichardt y cols. 2007) que van a permitir la formación de la placa celular y a su vez una alta tasa de endocitosis que contribuye al mismo proceso (Dhonukshe y cols. 2006). Esto sugiere que

proteínas de la maquinaria de tráfico vesicular y del sistema de endomembranas son altamente requeridas durante este proceso celular.

El 2001, el grupo de Bonifacino (Boehm y Bonifacino 2001) realizó un análisis filogenético respecto de la conservación de proteínas Adaptinas en los sistemas eucariontes. En ese entonces, reportó que AP-4 estaba sólo presente en plantas y mamíferos. Sin embargo, hoy existe gran cantidad de información de genomas, lo que nos llevó a realizar nuevos análisis filogenéticos. La Figura 17 muestra un análisis filogenético donde se agrupan GAMMAI-ADR y EPSILON-ADR desde levaduras a mamíferos. Interesantemente, a diferencia de GAMMAI-ADR que se encuentra presente en todos los sistemas, EPSILON-ADR sólo está presente en vertebrados y plantas, lo que sugiere que este tipo de proteínas debe cumplir una función necesaria en sistemas superiores y complejos.

Asimismo, se analizó la presencia de elementos CIS tipo MSA (Ito y cols. 1998) en las secuencias promotoras de los putativos ortólogos de este gen presentes en varios sistemas vertebrados, encontrando estos elementos en todas las secuencias analizadas (Tabla 6). Estos resultados sugieren que tanto en plantas como en vertebrados, *EPSILON-ADR* estaría siendo regulada positivamente durante la división celular, lo que apoya la idea de que esta proteína participaría en un proceso celular altamente regulado. Estos datos son interesantes y proponen una hipótesis que no ha sido abordada a la fecha, probar experimentalmente que estos motivos en CIS presentes en los

promotores de los ortólogos de Epsilon adaptina funcionan activados durante la división celular en otros sistemas, abordando la posible conservación de función biológica de esta proteína.

4.2 Niveles de transcrito y proteína de EPSILON-ADR, sugieren mecanismos moleculares de regulación tejido específico.

Específicamente en mamíferos ha si probado recientemente que AP-4 participa en el tráfico de proteínas precursoras de β -amilodes en el sistema nervioso central (Paolini y cols. 2011), mostrándose entonces que este complejo tiene una determinada función en un tejido específico. Por otro lado, en neuronas también se ha visto que AP-4 participa en otras dos funciones celulares, tráfico de receptores de glutamato y apoptosis (Yaps y cols. 2003, Matsuda y Yuzaki 2008). Todo esto correlacionado con los altos niveles de transcrito de los componentes del complejo AP-4 detectados ubicuamente distribuidos en distintas partes del cerebro en mamíferos (Yaps y cols. 2003). Nosotros hemos caracterizado la expresión de *EPSILON-ADR*, componente del putativo complejo AP-4 de *Arabidopsis thaliana*. Este gen presenta alta expresión en silicuas (Figura 3), órganos donde se forman, desarrollan y maduran los embriones que finalmente generarán una semilla lista para germinar. Asimismo, hemos observado que en ausencia de *EPSILON-ADR* (mutante nula *eps1.3*) las silicuas sufren defectos en su elongación, contenido de embriones y finalmente cantidad de semillas, sugiriendo que este gen cumple un rol importante en el

desarrollo de este órgano. Los análisis de cantidad o presencia de proteínas, muestran presencia de ésta en silicuas (Figura 7). Sin embargo, en órganos como flores hemos detectado la presencia de la proteína, pero los niveles de transcrito son muy inferiores respecto a los observados en silicuas. Además las flores presentan un desarrollo normal en las mutantes nulas para EPSILON-ADR, sugiriendo que la presencia de esta proteína en este órgano, no es necesaria para su correcto desarrollo. Estos datos nos hacen pensar que la presencia de esta proteína en flores es producto del almacenamiento o acumulación de azúcares para procesos posteriores, como la fecundación de la flor y el desarrollo de silicuas y embriones, sugiriendo que en tejidos como las flores la proteína EPSILON-ADR es estable y por esta razón los niveles de su transcrito no son correlacionables con los niveles de proteínas encontrados en ellas. Ejemplos de proteínas o moléculas estables o acumuladas en flores y/o gametos podrían estar relacionados con la fecundación misma, ya que tanto el polen como los órganos reproductores femeninos sufren severos cambios estructurales al iniciarse la fecundación por lo que dichos tejidos deben estar preparados molecular y metabólicamente para hacer frente a estos procesos (Higashiyama 2011).

4.3 La distribución de EPSILON-ADR sugiere un compartimiento subcelular no definido en tejidos específicos de la raíz

Una de las formas de acercarse a la determinación de función, rol o participación de una proteína en un determinado proceso celular, es el estudio

de su distribución celular y subcelular. En mamíferos, donde se ha caracterizado molecularmente esta proteína y sus compañeras del complejo AP-4, se ha demostrado que esta se asocia por interacción proteína-proteína directamente a una GTPasa pequeña ubicada en la membrana del TGN (Hirst y cols. 1999). El estudio de EPSILON-ADR a nivel de proteína fue abordado mediante la utilización de anticuerpos específicos contra esta proteína de *Arabidopsis*. Mediante inmunoblot determinamos que EPSILON-ADR se asocia a membranas. Sin embargo la naturaleza de esas membranas no la hemos podido dilucidar a pesar de haber realizado colocalizaciones con marcadores de distintos compartimientos subcelulares (Golgi, TGN, PVC, Endosomas de reciclaje, endosoma tardío, vacuola y retículo endoplasmático). Es importante señalar que a diferencia de las células animales, la célula vegetal es un complejo sistema que está rodeada por una pared celular que le da firmeza a la célula y a la planta completa y protege a la célula del medio extracelular (Liepman y cols. 2010). Además, posee un gran número de aparatos de Golgi, dictiosomas, que se distribuyen homogéneamente por todo el citoplasma. El retículo endoplasmático es de distribución cortical y, en vez de lisosomas, posee vacuolas líticas y de almacenamiento (Foresti y Denecke 2008). Estas diferencias hacen compleja la determinación de un compartimiento subcelular en la célula vegetal. Debido a esto, existe un gran número de marcadores que caracterizan compartimientos subcelulares (Brandizzi y cols. 2004; Hanton y Brandizzi 2006), si bien en este estudio se utilizaron nueve marcadores de compartimientos subcelulares no se puede descartar que no hayamos usado el

marcador correcto que se localice en organelos o comportamientos donde reside la proteína EPSILON-ADR o que efectivamente esta proteína se asocie a un nuevo compartimiento subcelular no descrito previamente.

Finalmente mediante inmunofluorescencia determinamos que EPSILON-ADR es una proteína tejido específica ya que se acumula en tipos celulares como corteza, epidermis y endodermis en raíces de *Arabidopsis* (Figura 10). La distribución espacial dentro de la planta completa o de órganos, como raíces, va a ayudar a entender los procesos celulares y fisiológicos en que participa nuestra proteína en estudio. Se ha estudiado y determinado que cada tejido o tipo celular de la raíz posee funciones específicas y es necesaria para el correcto desarrollo de este órgano. Las células del cortex o corteza son relevantes para la regulación de la respuesta gravitrópica en plantas debido a que en este tipo celular se provoca una relocalización de transportadores de Auxina (PIN2), proceso que es esencial para esta respuesta trópica (Rahman y cols. 2010). Las células de la epidermis, presentan la particularidad de regular por posición el desarrollo de pelos radiculares, siendo una capa celular que contribuye a la arquitectura de la raíz (Masucci y Schiefelbein 1996). Finalmente la cap lateral o caliptra lateral es un tejido protector, al igual que la columella (punta de la raíz), está a cargo de sensar señales del medio ambiente y es un tejido altamente secretor (Tsugeki y Fedoroff 1999). Estos tres tejidos de la raíz, donde EPSILON-ADR se acumula preferentemente, tienen en común ser tejidos externos que sensan, secretan y participan en respuestas fisiológicas de la planta como gravitropismo.

4.4 ¿EPSILON-ADR es parte de un complejo proteico en plantas?

Como se señaló previamente, en mamíferos la proteína EPSILON se asocia a tres proteínas formando el complejo adaptador AP-4 (Hirst y cols. 1999). Para dilucidar si esta proteína forma parte de un complejo proteico en plantas, se inmunoprecipitó la proteína usando el anticuerpo policlonal desarrollado en este estudio. Este experimento reveló que el anticuerpo es capaz de asociar una especie proteica de alto peso molecular (sobre 200 KDa, Figura 12). Este resultado sugiere que EPSILON-ADR podría formar parte de un complejo proteico, sin embargo nuestros resultados no nos permiten descartar que bajo nuestras condiciones experimentales, la proteína en estudio forme agregados que migran a un alto peso molecular en una electroforesis o que se trate de otro tipo de artefactos. Sin embargo, para poder determinar que esta banda de alto peso molecular está formada por un complejo de proteínas, se hace necesario secuenciar las eluciones o contar con anticuerpos que sean capaces de reconocer los componentes del putativo AP-4 de *Arabidopsis thaliana*. Recientemente el grupo de Friml (Zwiewka y cols. 2011) ha demostrado que el complejo AP-3 en plantas es capaz de coprecipitar sugiriendo su formación *in vivo*. Este hallazgo probó por primera vez que los APs de plantas son funcionalmente conservados. Estos resultados nos permiten pensar que EPSILON-ADR efectivamente formaría parte de un complejo de alto peso molecular, conformado por proteínas similares a las descritas en mamíferos para el complejo AP-4.

4.5 EPSILON-ADR y su participación en desarrollo embrionario y crecimiento de raíces

Una segunda estrategia para entender y dilucidar la función celular y fisiológica de una proteína, es mediante genética reversa, es decir buscar mutantes nulas y/o *knock down* en el gen de interés. El análisis fenotípico de mutantes permite entender como este gen regula o participa en procesos de la planta. En este estudio se caracterizaron tres mutantes insercionales para el locus de EPSILON-ADR. Dos de ellas son *Knock-down*, es decir, tienen disminuida la expresión del gen de interés. Sin embargo, el transcrito y su producto proteico están presentes en la planta. Ambas mutantes *Knock-down* no presentan fenotipos macroscópicos, sin embargo una tercera mutante que es nula o *Knock-out* para transcrito y producto proteico de EPSILON-ADR (Figura 13), presenta fenotipos en desarrollo embrionario y desarrollo de órganos como raíces, rosetas y tallos. En heterocigocidad, esta mutante presenta defectos durante el desarrollo embrionario, aborto de embriones y disminución en el largo de silicuas y número de embriones, estos defectos sugieren que EPSILON-ADR es una proteína relevante durante el desarrollo embrionario en plantas y que la ausencia o disminución de ésta durante este proceso genera letalidad embrionaria o disminución en la sobrevivencia del embrión, lo que puede ser producto de defectos en el correcto desarrollo de gametos.

Los gametos son tipos celulares con alta actividad secretora. Durante la elongación del tubo polínico, la célula debe destinar gran parte de su

maquinaria a la síntesis de membrana y pared celular así como también de proteínas de membrana, lo que sugiere una alta actividad del sistema de endomembranas (Li y cols. 1997). Los gametos femeninos de la planta, así como las flores son reservorios de proteínas de almacenamiento y azúcares (Makela y cols. 2005) que facilitan tanto la fecundación como el desarrollo del embrión y finalmente afectan la germinación de las semillas y el desarrollo durante los primeros días de la plántula, cuando su capacidad fotosintética está en desarrollo (Angeles-Nunez y Tiessen 2010; Fallahi y cols. 2008). *eps1.3*, la mutante nula para transcrito y producto proteico de EPSILON-ADR, presenta defectos en el desarrollo temprano de plántulas cuando se germinan en ausencia de sacarosa (Figura 13G-H), sugiriendo que presenta defectos en el almacenamiento de azúcares. Para comprobar esta hipótesis se midieron las concentraciones de glucosa total en semillas. Estos resultados muestran una disminución significativa de la cantidad de azúcares solubles totales en la mutante *eps1.3* respecto de semillas silvestres (Col-0), sugiriendo que el defecto en el crecimiento temprano de las plántulas en ausencia de sacarosa podría deberse a la disminución de azúcares en las semillas. Este defecto podría tener su origen durante el desarrollo embrionario temprano y durante el desarrollo de la flor, receptáculo del gameto femenino. Pese a estos defectos, las plantas homocigotas son capaces de generar semillas viables, sin embargo estas plantas presentan silicuas muy pequeñas (Figura 15) y con baja cantidad de embriones, sugiriendo que existe una vía alternativa que permite el desarrollo embrionario en estas mutantes. Una alternativa para explicar los

defectos durante el desarrollo embrionario es la división celular. Se ha reportado que en embriones la radícula se encuentra en fase G1 del ciclo celular (Yu y cols. 2003). El hecho de que las raíces de *eps1.3*, en ausencia de sacarosa, no sean capaces de crecer normalmente, sugiere que estas plantas no pueden activar la progresión del ciclo celular debido a defectos en detectar azúcares, ausencia de azúcares o incapacidad de detectar citoquinina o ambas. Tanto sacarosa como citoquinina son capaces de activar la progresión del ciclo celular induciendo a Ciclina D3 (Riou-Khamlichi y cols. 1999; Riou-Khamlichi y cols. 2000). Estos antecedentes sugieren que la ausencia de sacarosa o glucosa en el embrión impediría la entrada en división celular de las células de la raíz, deteniendo el crecimiento y desarrollo de este órgano. Nosotros hemos sido capaces de determinar que *EPSILON-ADR* es inducido fuertemente por sacarosa. Todos estos antecedentes en conjunto nos permiten sugerir que *EPSILON-ADR* sería necesaria para el desarrollo de la raíz durante la germinación y regularía directa o indirectamente el contenido de azúcares en el embrión. La activación de la expresión de *EPSILON-ADR* participaría en un proceso de feedback positivo, donde los carbohidratos almacenados en el embrión serían necesarios para inducir o activar la progresión del ciclo celular mediante la activación transcripcional de genes necesarios en este proceso celular, entre ellos *EPSILON-ADR* (Figura 23)

Por otro lado, estas mutantes presentan una pérdida de dominancia apical del tallo, es decir, pobre desarrollo vegetativo (rosetas pequeñas) y aumento en el número de inflorescencias. Este fenotipo podría ser un mecanismo

compensatorio que permitiría que estas plantas tengan un número de silicuas suficientes que les permitan preservarse hasta una próxima generación.

Dado que nuestros resultados muestran asociación de EPSILON-ADR a membranas, no es extraño pensar que forme parte del sistema de endomembranas y que participe en procesos de secreción y/o endocitosis y en el almacenamiento de azúcares y proteínas. Lo interesante es que además de participar en estos procesos, nuestros resultados asocian a esta proteína y su transcrito a la división celular (Figura 23). Especulando a partir de nuestros resultados podemos inferir o generar hipótesis acerca de que EPSILON-ADR participaría en procesos celulares vitales para el desarrollo embrionario, como son almacenamiento de azúcares y división celular.

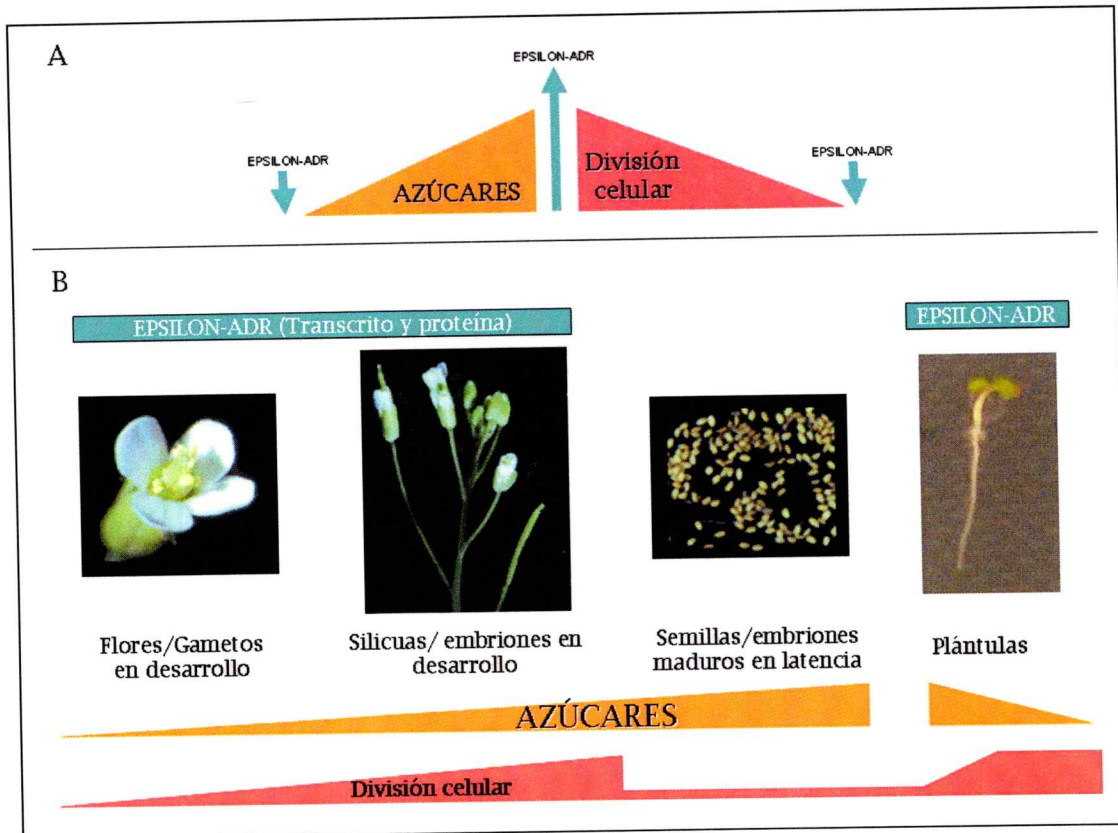


Figura 23. Esquema de los posibles mecanismos moleculares y fisiológicos en los que EPSILON-ADR participaría en plantas. A. EPSILON-ADR es inducido por sacarosa, a su vez, los azúcares activan la progresión del ciclo celular, induciendo división celular. B. Flores, silicuas y plántulas presentan EPSILON-ADR como proteína y transcritos, a su vez, estos órganos presentan alta división celular. Finalmente, los niveles de azúcares se incrementan desde la gametogénesis hasta la semilla en latencia, los que son utilizados en las primeras etapas de la germinación, donde la planta emergente no es fotosintéticamente activa.

4.6 GAMMA-ADR participaría en el desarrollo y crecimiento de órganos en plantas

Para entender la implicancia biológica de las proteínas GAMMA-ADRs en plantas, nos propusimos realizar estudios de genética reversa, es decir caracterizar mutantes nulas y/o *Knock down* para los tres loci presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Tabla 5). Paralelamente, diseñamos y

construimos plantas transgénicas que nos permitieran realizar la estrategia de ARN interferencia (RNAi) para silenciar o reducir la expresión de los tres genes simultáneamente. Esta última estrategia se planificó dado que en plantas es habitual que la ausencia de un gen de una familia génica sea suplida por otro gen de esa familia (Gruis y cols. 2002), impidiendo visualizar fenotipos que nos den luces de la función de ese gen en particular. Así esta estrategia nos permitió determinar que los tres loci de *GAMMA-ADRs* participarían en el desarrollo y crecimiento de órganos como rosetas, raíces y tallos, debido a que su crecimiento está alterado en las plantas RNAi.

Mediante genética reversa hemos visto que la ausencia o disminución de la expresión de *GAMMA-ADR* causa disminución en el tamaño de órganos como rosetas y tallos. La elongación y división celular son procesos que requieren alta tráfico vesicular secretor y endocítico para poder generar nuevas membranas y pared celular (Dhonukshe y cols. 2006; Ovecka y cols. 2005; Reichardt y cols. 2007). Asimismo, determinamos que estas mutantes presentan aumento en el desarrollo de raíces laterales. Este fenotipo nos permite inferir que *GAMMA-ADRs* podrían participar en dos procesos que regulan el desarrollo de este tipo de órganos: tráfico vesicular en las células que se reprograman para generar primordios de raíces laterales o en la división celular que permite la progresión del desarrollo de este tipo de órganos. Para poder responder estas hipótesis es necesario conocer el tipo celular en el que se acumulan *GAMMA-ADR* en raíces, ya que se ha descrito que las células del periciclo se reprograman para

entrar en división celular y generar las raíces laterales (Malamy y Benfey 1997). Finalmente, sabemos que el desarrollo de raíces laterales es regulado finamente por ciclo celular, y comunicación cruzada entre las hormonas citoquinina y auxina (Aloni y cols. 2006). Este último antecedente nos sugiere que el aumento en el número de primordios y raíces laterales en nuestras mutantes puede deberse a un defecto en la destinación de receptores o transportadores de las hormonas implicadas en el desarrollo de las raíces laterales.

4.7 El tráfico de KNOLLE hacia la degradación en vacuola podría estar mediado directa o indirectamente por GAMMA-ADRs en *Arabidopsis thaliana*

A nivel celular las plantas RNAi mostraron defectos en la acumulación de la proteína KNOLLE, sugiriendo que GAMMA-ADRs participarían en el tráfico de esta proteína. Fuimos capaces de ver aumento de la acumulación de KNOLLE en células post mitóticas pretratadas con Brefeldina A, droga que altera el tráfico endocítico y reciclaje a la membrana plasmática en plantas (Geldner y cols. 2003; Tanaka y cols. 2009). La proteína KNOLLE es una syntaxina que viaja desde el TGN hasta la placa celular en formación y se acumula exclusivamente en células en división (Reichardt y cols. 2007). Se ha descrito que luego de terminada la citocinesis, la proteína KNOLLE es llevada vía endosoma temprano y MVB a la vacuola, donde es degradada. Dicha ruta de tráfico es alterada por BFA (Reichardt y cols. 2007). Nuestros resultados

muestran que las mutantes RNAi presentan alta acumulación de KNOLLE en células post mitóticas en presencia de BFA, sugiriendo que el tránsito alterado por BFA puede ser la ruta por la cual GAMMA-ADRs participa en su tráfico. Asimismo, la mutante nula para GAMMAIII-ADR (*gamm3-6*) presenta mayor acumulación de KNOLLE, sugiriendo que GAMMAIII-ADR, estaría implicada en el tráfico de KNOLLE hacia la vacuola para su degradación. Sin embargo, estos resultados también sugieren la existencia de una ruta alternativa que lleva a KNOLLE hacia la vacuola, debido a que la acumulación de la proteína no es excesivamente alta sugiriendo una lenta degradación, pero no nula. Esta conclusión tiene soporte en el modelo generado por Reichardt y cols (2007, Figura 24A), donde se propone que existen 2 rutas paralelas para el tráfico de KNOLLE desde la placa celular a la vacuola, ambas sensibles a wortmanina. Ellos proponen que existe una ruta dependiente de BFA donde KNOLLE va al TGN o endosoma temprano y luego vía MVB (cuerpos multi vesiculares) llega a la vacuola para su degradación (Reichardt y cols. 2007). La otra ruta va directamente desde el MVB hacia la vacuola sin pasar por TGN. Finalmente, el tráfico desde TGN a MVB es alterado por BFA, por lo que KNOLLE se acumula en TGN bajo esta condición (Reichardt y cols. 2007). En nuestras mutantes RNAi, la señal de KNOLLE y el tamaño de los cuerpos KNOLLE positivos son mayores (Figura 21, Figura 24B), sugiriendo que la degradación de KNOLLE en la vacuola es más lenta cuando el transcrito de los tres GAMMA-ADRs está disminuido. Paralelamente la mutante nula para GAMMAIII-ADR presenta mayor cantidad de KNOLLE (Figura 21) aun sin tratamiento con BFA,

sugiriendo que la ausencia de esta proteína provoca un retardo en la degradación o un aumento en la síntesis de novo de la proteína. Midiendo los niveles de expresión de *KNOLLE* y usando cicloheximida para detener la síntesis *de novo* de proteínas, podríamos establecer si este aumento en *KNOLLE* es por un retardo en la degradación de *KNOLLE* específicamente.

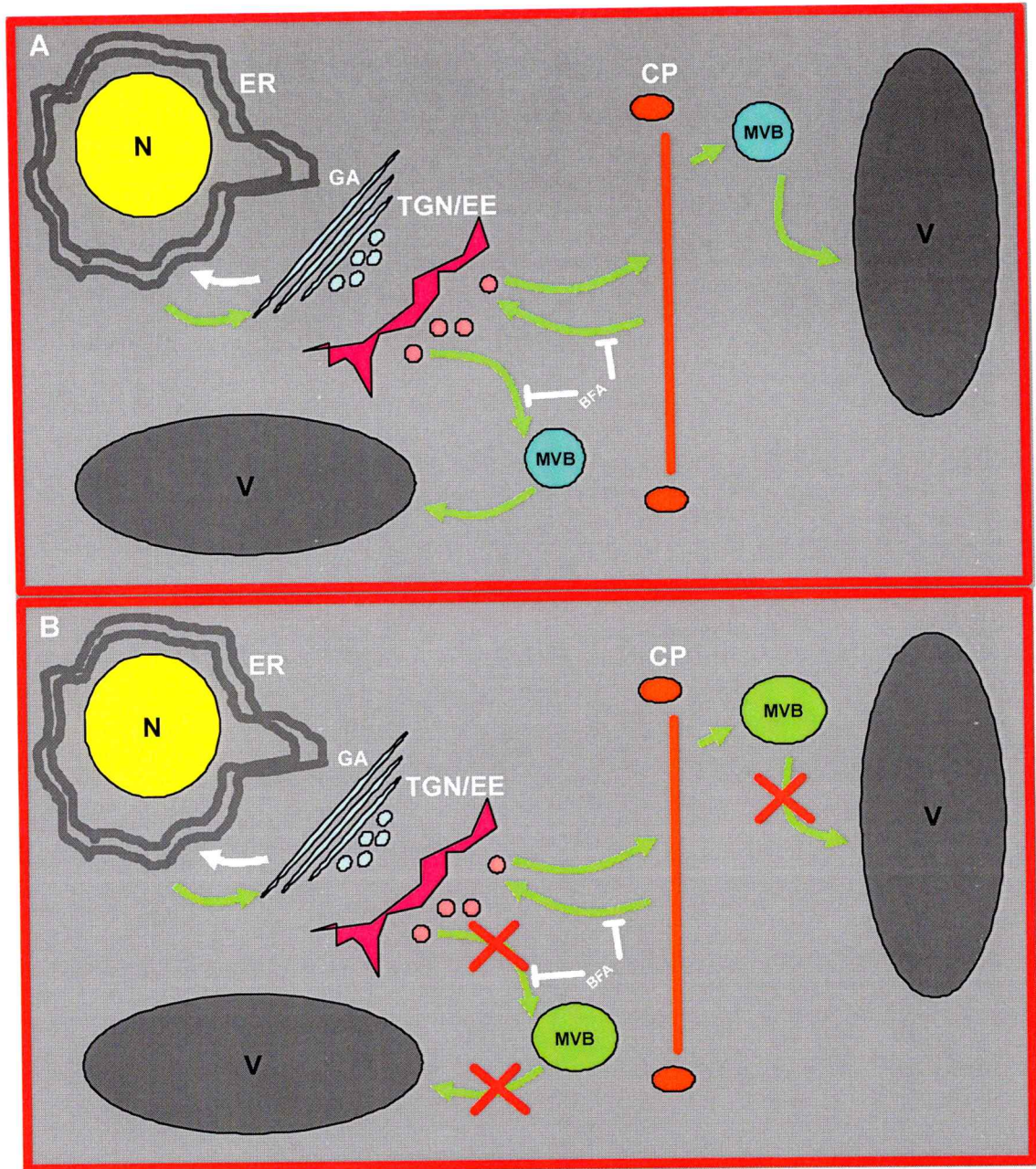


Figura 24. Esquema que representa las posibles rutas donde GAMMA-ADRs participarían en el tráfico de KNOLLE. Tráfico de la proteína KNOLLE (flechas verdes) basado en el trabajo de Reichardt y cols. (2007). Célula vegetal silvestre (A), célula de mutantes para GAMMA-ADRs (B). Barras blancas representan las rutas bloqueadas por BFA. Cruces en rojo representan las posibles vías donde GAMMA-ADRs participan. En el tráfico de KNOLLE. Flecha blanca representa el tráfico retrógrado desde GA hacia ER. N, núcleo. ER, retículo endoplasmático. MVB, cuerpos multivesiculares. V, vacuola. TGN, red trans Golgi. EE, endosoma temprano. GA, aparato de Golgi. CP, placa celular.

4.8 GAMMAI-ADR está asociada a estructuras intracelulares en células de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

Ha sido reportado por el grupo de Hwang (Song y cols. 2006) que en protoplastos transformados, la ubicación subcelular de GAMMAI-ADR es el TGN y PVC y participaría con proteínas EPSINAS y VSR para el tráfico vesicular a la vacuola central de la célula vegetal. Nosotros utilizando una proteína de fusión con GFP bajo un promotor constitutivo (35S) fuimos capaces de mostrar que GAMMAI-ADR posee una distribución punteada dentro de las células de la punta de la raíz, lo que sugiere asociación a estructuras intracelulares. A su vez, esta distribución es insensible a BFA y no colocaliza con KNOLLE, (Figura 22). Es importante destacar que no podemos descartar que esta distribución y su insensibilidad a BFA sean artefactos de la sobreexpresión del gen, es decir, la alta abundancia de la proteína puede provocar agregados de proteínas que se muestren como un patrón punteado distribuido homogéneamente por la célula y que por esta distribución veamos insensibilidad a BFA. Sin embargo, existen antecedentes publicados en la literatura que muestran que en plantas el complejo AP-3 también es insensible a BFA (Feraru y cols. 2010) y nosotros mostramos que EPSILON-ADR (posible componente de AP-4) serían insensibles a BFA. Estos antecedentes sugieren que la distribución de los APs en plantas podrían ser insensibles a esta droga, a diferencia de lo que está reportado para animales y levaduras (Boehm y Bonifacino 2002; Simmen y cols. 2002). Asimismo, el posible artefacto de

GAMMAI-ADR, no colocalizaría con KNOLLE, debido a que serían agregados citosólicos. Para descartar el hecho de una posible agregación citosólica por la abundancia ectópica de la proteína sobreexpresada, se debería realizar fraccionamiento subcelular y determinar que esta proteína cofracciona con algún extracto específico y que esta distribución no es alterada por pretratamientos con BFA.

Finalmente, los resultados en conjunto hacen interesante el estudio de estos fenotipos en las mutantes individuales para cada GAMMA-ADR, así como la fusión con GFP de cada una de las tres proteínas para determinar cuál proteína o más de una de ellas, participan en esta ruta descrita para el tráfico de KNOLLE desde la placa celular hacia la vacuola en células post mitóticas.

5 Conclusiones

En esta tesis doctoral se propuso describir y caracterizar las funciones biológicas de las proteínas tipo Adaptinas presentes en *Arabidopsis thaliana*. Para esto, se seleccionaron dos Adaptinas que en mamíferos han sido descritas como participantes en el tráfico vesicular secretorio y de la red post Golgi, GAMMA Adaptina, componente del complejo AP-1 y EPSILON Adaptina, componente del complejo AP-4. Nuestros resultados a nivel celular nos sugieren que en *Arabidopsis thaliana*:

- a) EPSILON-ADR se asocia a membranas intracelulares y a diferencia de lo descrito para los sistemas animales, nuestros resultados muestran que en plantas la distribución celular de esta proteína es insensible a BFA;
- b) EPSILON-ADR tiene una distribución preferentemente cortical en células en división y en interfase se distribuye por toda la célula homogéneamente. Por otro lado, GAMMA-ADR se distribuye homogéneamente en las células de la raíz.
- c) nuestro resultado sugieren que GAMMA-ADRs participarían en el tráfico de KNOLLE hacia la vacuola, lo que la relacionaría a un proceso celular como el tráfico vesicular post mitosis (Figura 21);
- d) mediante análisis de expresión hemos determinado que EPSILON-ADR es regulada positivamente por sacarosa y citoquinina, ambos compuestos capaces de inducir división celular en plantas, sugiriendo

que esta proteína puede ser requerida durante este proceso celular, lo que se confirmó midiendo la alta expresión de *EPSILON-ADR* durante mitosis en células en suspensión (Figura 4 y 5).

A nivel de planta completa podemos concluir que:

- a) ambas proteínas participan en el crecimiento y desarrollo de órganos en *Arabidopsis thaliana*;
- b) *GAMMA-ADR* está involucrada en el desarrollo de raíces laterales y crecimiento de raíz primaria, mientras *EPSILON-ADR* está involucrada en crecimiento la raíz primaria;
- c) la ausencia o disminución de ambas proteínas y su transcrito generan defectos en el crecimiento y desarrollo de hojas y tallos. Específicamente, *EPSILON-ADR* participa directa o indirectamente en la dominancia apical del tallo (Figura 14);
- d) *EPSILON-ADR* esta involucrado en el desarrollo embrionario y crecimiento de silicuas. Este fenotipo se apoya en la alta acumulación del transcrito y la presencia de proteína en este tejido vegetal (Figura 3 y 7A).

Además, es importante destacar que esta tesis generó herramientas moleculares como anticuerpos policlonales específicos para *EPSILON-ADR* de *Arabidopsis thaliana*. Además generamos plantas transgénicas que sobreexpresan *GAMMA-ADR* fusionada a GFP y plantas con los tres transcritos de *GAMMA-ADR* de *Arabidopsis* con bajos niveles de transcrito.

Estas herramientas serán útiles en el futuro para seguir ahondando en el estudio de estas proteínas en plantas y sus funciones celulares.

6 Referencias

Aloni, Aloni, Langhans y Ullrich (2006). "Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism." Annals of botany **97**(5): 883-893.

Angeles-Nunez y Tiessen (2010). "Arabidopsis sucrose synthase 2 and 3 modulate metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds." Planta **232**(3): 701-718.

Barth y Holstein (2004). "Identification and functional characterization of Arabidopsis AP180, a binding partner of plant alphaC-adaptin." Journal of cell science **117**(Pt 10): 2051-2062.

Berdnik, Torok, Gonzalez-Gaitan y Knoblich (2002). "The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila." Developmental cell **3**(2): 221-231.

Boehm y Bonifacino (2001). "Adaptins: the final recount." Molecular biology of the cell **12**(10): 2907-2920.

Boehm y Bonifacino (2002). "Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals." Gene **286**(2): 175-186.

Borisjuk (1998). "High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of Vicia faba in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger." The Plant Journal, **15**: 583-591.

Boutte, Crosnier, Carraro, Traas y Satiat-Jeunemaitre (2006). "The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins." Journal of cell science **119**(Pt 7): 1255-1265.

Brandizzi, Irons, Johansen, Kotzer y Neumann (2004). "GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system." Journal of microscopy **214**(Pt 2): 138-158.

Burgos, Mardones, Rojas, daSilva, Prabhu, Hurley y Bonifacino (2010). "Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex." Developmental cell **18**(3): 425-436.

Cao, Crest, Fasulo y Sullivan (2010). "Cortical Actin Dynamics Facilitate Early-Stage Centrosome Separation." Current biology : CB.

Clough y Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana." The Plant journal : for cell and molecular biology **16**(6): 735-743.

Chen y Kado (1994). "Inhibition of Agrobacterium tumefaciens oncogenicity by the osa gene of pSa." Journal of bacteriology **176**(18): 5697-5703.

Dell'Angelica (2009). "AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade." Current opinion in cell biology **21**(4): 552-559.

Dell'Angelica, Shotelersuk, Aguilar, Gahl y Bonifacino (1999). "Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor." Molecular cell **3**(1): 11-21.

Dello Iorio, Nakamura, Moubayidin, Perilli, Taniguchi, Morita, Aoyama, Costantino y Sabatini (2008). "A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem." Science **322**(5906): 1380-1384.

Dhonukshe, Baluska, Schlicht, Hlavacka, Samaj, Friml y Gadella (2006). "Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis." Developmental cell **10**(1): 137-150.

Eugster, Frigerio, Dale y Duden (2000). "COP I domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP." The EMBO journal **19**(15): 3905-3917.

Fallahi, Scofield, Badger, Chow, Furbank y Ruan (2008). "Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of Arabidopsis thaliana reveals diverse roles for SUS during development." Journal of experimental botany **59**(12): 3283-3295.

Fendrych, Synek, Pecenkova, Toupalova, Cole, Drdova, Nebesarova, Sedinova, Hala, Fowler y Zarsky (2010). "The Arabidopsis exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation." The Plant cell **22**(9): 3053-3065.

Feraru, Paciorek, Feraru, Zwiewka, De Groot, De Rycke, Kleine-Vehn y Friml (2010). "The AP-3 beta adaptin mediates the biogenesis and function of lytic vacuoles in Arabidopsis." The Plant cell **22**(8): 2812-2824.

Foresti y Denecke (2008). "Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function." Traffic **9**(10): 1599-1612.

Garcia, Nikolic y Piguet (2008). "HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3." Traffic **9**(2): 200-214.

Geldner, Anders, Wolters, Keicher, Kornberger, Muller, Delbarre, Ueda, Nakano y Jurgens (2003). "The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth." Cell **112**(2): 219-230.

Geldner, Richter, Vieten, Marquardt, Torres-Ruiz, Mayer y Jurgens (2004). "Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of Arabidopsis." Development **131**(2): 389-400.

Gelvin (2000). "Agrobacterium and Plant Genes Involved in T-DNA Transfer and Integration." Annual review of plant physiology and plant molecular biology **51**: 223-256.

Glyvuk, Tsytsyura, Geumann, D'Hooge, Huve, Kratzke, Baltés, Boening, Klingauf y Schu (2010). "AP-1/sigma1B-adaptin mediates endosomal synaptic vesicle recycling, learning and memory." The EMBO journal **29**(8): 1318-1330.

Gruis, Selinger, Curran y Jung (2002). "Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases." The Plant cell **14**(11): 2863-2882.

Gu, Schuske, Watanabe, Liu, Baum, Garriga y Jorgensen (2008). "Mu2 adaptin facilitates but is not essential for synaptic vesicle recycling in *Caenorhabditis elegans*." The Journal of cell biology **183**(5): 881-892.

Haga, Kato, Murase, Araki, Kubo, Demura, Suzuki, Muller, Voss, Jurgens y Ito (2007). "R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*." Development **134**(6): 1101-1110.

Hala, Soukupova, Synek y Zarsky (2010). "Arabidopsis RAB geranylgeranyl transferase beta-subunit mutant is constitutively photomorphogenic, and has shoot growth and gravitropic defects." The Plant journal : for cell and molecular biology **62**(4): 615-627.

Hanton y Brandizzi (2006). "Fluorescent proteins as markers in the plant secretory pathway." Microscopy research and technique **69**(3): 152-159.

Haseloff, Siemering, Prasher y Hodge (1997). "Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark

transgenic Arabidopsis plants brightly." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(6): 2122-2127.

Higashiyama (2011). "Peptide signaling in pollen-pistil interactions." Plant Cell Physiol **51**(2): 177-189.

Hirano, Harashima, Shinmyo y Sekine (2008). "Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation." Plant Mol Biol **66**(3): 259-275.

Hirano, Shinmyo y Sekine (2011). "Arabidopsis G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation." Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale **49**(6): 687-691.

Hirst, Bright, Rous y Robinson (1999). "Characterization of a fourth adaptor-related protein complex." Molecular biology of the cell **10**(8): 2787-2802.

Hirst y Robinson (1998). "Clathrin and adaptors." Biochimica et biophysica acta **1404**(1-2): 173-193.

Inoue, Nojima y Okayama (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.

Ito (2000). "Factors controlling cyclin B expression." Plant molecular biology **43**(5-6): 677-690.

Ito, Araki, Matsunaga, Itoh, Nishihama, Machida, Doonan y Watanabe (2001). "G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors." The Plant cell **13**(8): 1891-1905.

Ito, Iwase, Kodama, Lavisse, Komamine, Nishihama, Machida y Watanabe (1998). "A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription." The Plant cell **10**(3): 331-341.

Ito, Marie-Claire, Sakabe, Ohno, Hata, Kouchi, Hashimoto, Fukuda, Komamine y Watanabe (1997). "Cell-cycle-regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures." Plant J **11**(5): 983-992.

Ito, Marie-Claire, Sakabe, Ohno, Hata, Kouchi, Hashimoto, Fukuda, Komamine y Watanabe (1997). "Cell-cycle-regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures." The Plant journal : for cell and molecular biology **11**(5): 983-992.

Jaillais, Santambrogio, Rozier, Fobis-Loisy, Miede y Gaude (2007). "The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants." Cell **130**(6): 1057-1070.

Jameson y Wolf (1988). "The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants." Computer applications in the biosciences : CABIOS **4**(1): 181-186.

Jurgens (2005). "Plant cytokinesis: fission by fusion." Trends in cell biology **15**(5): 277-283.

Kang, Busse y Bednarek (2003). "Members of the Arabidopsis dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth." The Plant cell **15**(4): 899-913.

Kang, Busse, Dickey, Rancour y Bednarek (2001). "The arabidopsis cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1Ap, is required for multiple stages of plant growth and development." Plant physiology **126**(1): 47-68.

Kanethi, Qiao, Diaz, Peden, Meyer, Carskadon, Kapfhammer, Sufalko, Robinson, Noebels y Burmeister (1998). "Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles." Neuron **21**(1): 111-122.

Katzen (2007). "Gateway® recombinational cloning: a biological operating system" Expert Opinion on Drug Discovery **2**(4): 571-589.

Kleine-Vehn, Dhonukshe, Sauer, Brewer, Wisniewska, Paciorek, Benkova y Friml (2008). "ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis." Current biology : CB **18**(7): 526-531.

Kolaskar y Tongaonkar (1990). "A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens." FEBS letters **276**(1-2): 172-174.

Laporte, Oakley, Zhang, Holt, Ferguson, Caron y Barak (1999). "The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(7): 3712-3717.

Lauber, Waizenegger, Steinmann, Schwarz, Mayer, Hwang, Lukowitz y Jurgens (1997). "The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin." The Journal of cell biology **139**(6): 1485-1493.

Lee, Kim, Kang, Jang, Lee, Lee y Hwang (2007). "EpsinR2 interacts with clathrin, adaptor protein-3, AtVT112, and phosphatidylinositol-3-phosphate. Implications for EpsinR2 function in protein trafficking in plant cells." Plant physiology **143**(4): 1561-1575.

Lee, Park, Ku, Ha, Kim, Kim, Oh y Kim (2007). "Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response." Molecular genetics and genomics : MGG **277**(2): 115-137.

Li, Moscatelli, Cai y Cresti (1997). "Functional interactions among cytoskeleton, membranes, and cell wall in the pollen tube of flowering plants." International review of cytology **176**: 133-199.

Liepman, Wightman, Geshi, Turner y Scheller (2010). "Arabidopsis - a powerful model system for plant cell wall research." The Plant journal : for cell and molecular biology **61**(6): 1107-1121.

Lukowitz, Mayer y Jurgens (1996). "Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product." Cell **84**(1): 61-71.

Lloyd, Ramaswami y Kramer (1998). "Not just pretty eyes: Drosophila eye-colour mutations and lysosomal delivery." Trends in cell biology **8**(7): 257-259.

Makela, McLaughlin y Boyer (2005). "Imaging and quantifying carbohydrate transport to the developing ovaries of maize." Annals of botany **96**(5): 939-949.

Malamy y Benfey (1997). "Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana." Development **124**(1): 33-44.

Margalit, Spouge, Cornette, Cease, Delisi y Berzofsky (1987). "Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence." Journal of immunology **138**(7): 2213-2229.

Masucci y Schiefelbein (1996). "Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the Arabidopsis root." The Plant cell **8**(9): 1505-1517.

Matsuda y Yuzaki (2008). "AP-4: autophagy-four mislocalized proteins in axons." Autophagy **4**(6): 815-816.

Men, Boutte, Ikeda, Li, Palme, Stierhof, Hartmann, Moritz y Grebe (2008). "Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity." Nature cell biology **10**(2): 237-244.

Menges y Murray (2002). "Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity." The Plant journal : for cell and molecular biology **30**(2): 203-212.

Menges y Murray (2004). "Cryopreservation of transformed and wild-type Arabidopsis and tobacco cell suspension cultures." The Plant journal : for cell and molecular biology **37**(4): 635-644.

Muller, Beck, Mettbach, Komis, Hause, Menzel y Samaj (2010). "Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane." The Plant journal : for cell and molecular biology **61**(2): 234-248.

Mullins, Hartnell y Bonifacino (2000). "Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in *Drosophila melanogaster*." Molecular & general genetics : MGG **263**(6): 1003-1014.

Nakagawa, Kurose, Hino, Tanaka, Kawamukai, Niwa, Toyooka, Matsuoka, Jinbo y Kimura (2007). "Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation." Journal of bioscience and bioengineering **104**(1): 34-41.

Ovecka, Lang, Baluska, Ismail, Illes y Lichtscheidl (2005). "Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs." Protoplasma **226**(1-2): 39-54.

Paolini, Radeghieri, Civini, Caimi y Ricotta (2011). "The Epsilon hinge-ear region regulates membrane localization of the AP-4 complex." Traffic.

Park, Rancour y Bednarek (2008). "In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation." Plant physiology **148**(1): 246-258.

Polit, Maszewski y Kazmierczak (2003). "Effect of BAP and IAA on the expression of G1 and G2 control points and G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*." Cell biology international **27**(7): 559-566.

Pourcher, Santambrogio, Thazar, Thierry, Fobis-Loisy, Miege, Jaillais y Gaude (2010). "Analyses of sorting nexins reveal distinct retromer-subcomplex functions in development and protein sorting in *Arabidopsis thaliana*." The Plant cell **22**(12): 3980-3991.

Qiao, Jiang, Lee, Park, Choi, Piao, Woo, Roh, Han, Paek, Seo y Koh (2010). "SPL28 encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium

subunit micro 1 (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*Oryza sativa*).
The New phytologist **185**(1): 258-274.

Rahman, Takahashi, Shibasaki, Wu, Inaba, Tsurumi y Baskin (2010). "Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells."
The Plant cell **22**(6): 1762-1776.

Reichardt, Stierhof, Mayer, Richter, Schwarz, Schumacher y Jurgens (2007). "Plant cytokinesis requires de novo secretory trafficking but not endocytosis."
Current biology : **CB 17**(23): 2047-2053.

Riou-Khamlichi, Huntley, Jacquard y Murray (1999). "Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin."
Science **283**(5407): 1541-1544.

Riou-Khamlichi, Menges, Healy y Murray (2000). "Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression."
Molecular and cellular biology **20**(13): 4513-4521.

Robinson y Bonifacino (2001). "Adaptor-related proteins."
Current opinion in cell biology **13**(4): 444-453.

Santelia, Henrichs, Vincenzetti, Sauer, Bigler, Klein, Bailly, Lee, Friml, Geisler y Martinoia (2008). "Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses."
The Journal of biological chemistry **283**(45): 31218-31226.

Schmit y Lambert (1987). "Characterization and dynamics of cytoplasmic F-actin in higher plant endosperm cells during interphase, mitosis, and cytokinesis."
The Journal of cell biology **105**(5): 2157-2166.

Schmittgen y Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method."
Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.

Simmen, Honing, Icking, Tikkanen y Hunziker (2002). "AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells."
Nature cell biology **4**(2): 154-159.

Sollner, Glasser, Wanner, Somerville, Jurgens y Assaad (2002). "Cytokinesis-defective mutants of *Arabidopsis*."
Plant physiology **129**(2): 678-690.

Song, Lee, Lee, Yoo y Hwang (2006). "*Arabidopsis* EPSIN1 plays an important role in vacuolar trafficking of soluble cargo proteins in plant cells via interactions with clathrin, AP-1, VT111, and VSR1."
The Plant cell **18**(9): 2258-2274.

Sorkin y Carpenter (1993). "Interaction of activated EGF receptors with coated pit adaptins." Science **261**(5121): 612-615.

Steinmann, Geldner, Grebe, Mangold, Jackson, Paris, Galweiler, Palme y Jurgens (1999). "Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF." Science **286**(5438): 316-318.

Strompen, El Kasmi, Richter, Lukowitz, Assaad, Jurgens y Mayer (2002). "The Arabidopsis HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner." Current biology : **CB 12**(2): 153-158.

Studier y Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.

Tanaka, Ishikawa, Kitamura, Takahashi, Soyano, Machida y Machida (2004). "The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis." Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms **9**(12): 1199-1211.

Tanaka, Kitakura, De Rycke, De Groodt y Friml (2009). "Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking." Current biology : **CB 19**(5): 391-397.

Tsugeki y Fedoroff (1999). "Genetic ablation of root cap cells in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(22): 12941-12946.

Ueda, Yamaguchi, Uchimiya y Nakano (2001). "Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana." The EMBO journal **20**(17): 4730-4741.

Vroemen, Langeveld, Mayer, Ripper, Jurgens, Van Kammen y De Vries (1996). "Pattern Formation in the Arabidopsis Embryo Revealed by Position-Specific Lipid Transfer Protein Gene Expression." The Plant cell **8**(5): 783-791.

Wadsworth (1993). "Mitosis: spindle assembly and chromosome motion." Current opinion in cell biology **5**(1): 123-128.

Waizenegger, Lukowitz, Assaad, Schwarz, Jurgens y Mayer (2000). "The Arabidopsis KNOLLE and KEULE genes interact to promote vesicle fusion during cytokinesis." Current biology : **CB 10**(21): 1371-1374.

Wang, Liao, Zhu, Peng y Sun (2008). "NtGNL1 is involved in embryonic cell division patterning, root elongation, and pollen tube growth in tobacco." The New phytologist **179**(1): 81-93.

Wesley, Helliwell, Smith, Wang, Rouse, Liu, Gooding, Singh, Abbott, Stoutjesdijk, Robinson, Gleave, Green y Waterhouse (2001). "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." Plant J **27**(6): 581-590.

Willingham, Maxfield y Pastan (1980). "Receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin in cultured fibroblasts." The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society **28**(8): 818-823.

Xiao, Redman, Monaghan, Zhuang, Underwood, Moskal, Wang, Wu y Town (2010). "High throughput generation of promoter reporter (GFP) transgenic lines of low expressing genes in Arabidopsis and analysis of their expression patterns." Plant Methods **6**: 18.

Xin, Velten, Oliver y Burke (2003). "High-throughput DNA extraction method suitable for PCR." BioTechniques **34**(4): 820-824, 826.

Yap, Murate, Kishigami, Muto, Kishida, Hashikawa y Yano (2003). "Adaptor protein complex-4 (AP-4) is expressed in the central nervous system neurons and interacts with glutamate receptor delta2." Molecular and cellular neurosciences **24**(2): 283-295.

Yu, Steinmetz, Meyer, Brown y Shen (2003). "The tobacco A-type cyclin, Nicta;CYCA3;2, at the nexus of cell division and differentiation." The Plant cell **15**(12): 2763-2777.

Zeeh, Zeghouf, Grauffel, Guibert, Martin, Dejaegere y Cherfils (2006). "Dual specificity of the interfacial inhibitor brefeldin a for arf proteins and sec7 domains." The Journal of biological chemistry **281**(17): 11805-11814.

Zhang, Shen, He, Du, Xie, Luo, Zhang y Chen (2005). "Characterization of a novel cell cycle-related gene from Arabidopsis." J Exp Bot **56**(413): 807-816.

Zhou, Yang y Jong (1990). "Mini-prep in ten minutes." BioTechniques **8**(2): 172-173.

Zwiewka, Feraru, Moller, Hwang, Feraru, Kleine-Vehn, Weijers y Friml (2011). "The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in Arabidopsis." Cell Res.