

UCH-FC  
Biotecnología  
P426  
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS



**“Análisis del Efecto de Sortin2 en la Respuesta a Auxinas y en el Sistema de Endomembranas en *Arabidopsis thaliana*”**

Memoria de Título  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

**PATRICIO IGNACIO PÉREZ HENRÍQUEZ**

Septiembre, 2009  
Santiago - Chile



Director de Tesis: Dr. Lorena Norambuena Morales  
Laboratorio Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“Análisis del Efecto de Sortin2 en la Respuesta a Auxinas y en el Sistema de Endomembranas en *Arabidopsis thaliana*”

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

**PATRICIO IGNACIO PÉREZ HENRÍQUEZ**

**Director Seminario de Título**

*Dr. Lorena Norambuena Morales*

Firma manuscrita en azul de Lorena Norambuena Morales, sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación**

Dr. Ana Preller Simmons  
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Ana Preller Simmons, sobre una línea horizontal.

Dr. Gabriel León González  
Evaluador

Firma manuscrita en azul de Gabriel León González, sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, 30 de Septiembre de 2009.

# BIOGRAFÍA



Nací en la hermosa ciudad de Iquique. Allí crecí también; aprendí a andar en bici, a capear las olas, a llegar a las boyas, ohhh que hazaña!. Al menos cuando tienes 10 años!. Tengo gran parte de los mejores recuerdos de mi vida situados allí. A los 8 y 13 tuve unas pequeñas "pasantías" en la capital. La segunda vez, ingresé a los boys scout. Con Nico Pérez, Claudio y Agliati, corrimos por todo Santiago, subí el cerro San Cristóbal un montón de veces, viajé al sur!, una gran experiencia para un nortino!

Jugué rugby en el barro, y hasta apagué un incendio forestal (que nosotros no empezamos! :)

Luego de mis incursiones por la capital, cursé la enseñanza media en mi ciudad natal. El Liceo Academia Iquique me acogió durante 4 años. Allí forjé mis grandes amistades y digo con soltura que viví los años más enriquecedores de mi vida. Pasé los cuatro años entre las clases, la puerta a la cultura, mi guitarra, entrenamiento de volley, las olimpiadas de química, los aniversarios, las inolvidables fiestas, los paseos de curso, uno que otro pololeo y finalmente la "preparación para la PSU".

Entré a "la Chile", porque quería vivir universalidad en la universidad. Conocí gente fabulosa, y también gente que me decepcionó, viví el amor y el desamor, cambié mi manera de pensar en tantas cosas, gocé y sufrí también claro. En el fondo, en mi paso por la Chile, crecí. Cuando hacía falta más experiencias, las busqué afuera de mi Chilito lindo. Gringolandia me acogió durante un semestre y, a pesar de los problemas personales o tal vez a causa de éstos, logré madurar un poquito más. Comencé a tener fe en Dios, a tener certeza de lo imposible, a amar.

Siento que el camino recién comienza, que tal vez esta biografía debería haber tomado sólo el primer párrafo, que el resto se escribirá con el tiempo, con objetivos, con anhelos, trabajando por ellos, buscando ayuda, aceptando ayuda, amando, agradeciendo y siempre teniendo en mente que se puede ser un poquito mejor persona. Que con eso alegramos al resto, que con eso honramos al resto, a los que se fueron ó a los que aún están, a los que te aman ó te amaron, a los que siempre, a pesar de todo, estuvieron allí.

Sin duda, todo mi pasado me ha ayudado a construir mi presente y, con inteligencia, mi futuro.

Te amo viejo, mami, hermano. Este soy yo.



## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, por todo el amor, apoyo y compañía que me han dado.



*"Usted no puede depender de sus ojos,  
cuando su imaginación está desenfocada"*

Mark Twain.

*"Estoy en absoluto desacuerdo con tus ideas,  
pero daría mi vida por defender tu derecho a expresarlas"*

Voltaire

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Lorena Norambuena, mi tutor, por su apoyo incondicional, sus consejos y la instrucción que me entrega para formarme como científico. También expresar la profunda gratitud que siento por mi madre, mi padre y mi hermano, quienes han hecho mi formación como persona y profesional posible. A todos los miembros del *Laboratorio de Biología Molecular Vegetal* de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en especial a Nallatt Ocaez, Patricio Mandujano, Carlos Flores, Lorena Pizarro y Nelly Nova por su constante apoyo y disposición a compartir sus conocimientos y comentarios. Y a la persona que me hurtó el corazón Carolina Rosas.



## FINANCIAMIENTO

- PROYECTO FONDECYT 11080240

SECRETORY AND ENDOCYTIC SYSTEM IN ARABIDOPSIS THALIANA: CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISM OF SORTIN2, A SYNTHETIC COMPOUND THAT AFFECTS ENDOMEMBRANE SYSTEM.

- INICIATIVA CIENTIFICA MILENIO P02-009-F

NÚCLEO MILENIO DE BIOTECNOLOGÍA CELULAR VEGETAL.



# ÍNDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
FINANCIAMIENTO .....	iv
INDICE .....	v
INDICE DE FIGURAS .....	viii
ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Auxinas en el desarrollo de plantas .....	1
1.2 Polaridad en plantas.....	3
1.3 Sistema de endomembranas en plantas .....	7
1.4 Sortin2 y sus efectos en <i>A. thaliana</i> .....	8
Hipótesis.....	10
Objetivos .....	10
<i>General</i> .....	10
<i>Específico</i> .....	10
MÉTODOS .....	11
2.1 Esterilización de semillas .....	11
2.2 Cultivo de plantas.....	11



2.3 Tratamientos con Sortin2 .....	12
2.4 Tratamientos con hormonas auxinas .....	12
2.5 Tratamiento de oscuridad .....	13
2.6 Análisis de la morfología de <i>A. thaliana</i> .....	13
2.7 Análisis de la respuesta a auxinas .....	13
2.7.1 Ensayo histoquímico .....	16
2.7.2 Ensayo fluorométrico .....	16
2.8 Análisis de la localización subcelular de los facilitadores de auxinas y de la proteína de membrana BRI1 .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	21
3.1 Sortin2 altera el crecimiento y el gravitropismo en <i>A. thaliana</i> .....	21
3.2 Sortin2 altera la morfología de la raíz de <i>A. thaliana</i> .....	23
3.3 Sortin2 altera la respuesta a la auxina IAA .....	26
3.3.1 Ensayo histoquímico .....	26
3.3.2 Ensayo fluorométrico .....	29
3.4 Sortin2 altera la respuesta de IAA, NAA y 2,4-D .....	33
3.5 Localización de los facilitadores de auxina PIN1 y PIN2 fusionado a la proteína reportera GFP en condiciones controles. ....	35
3.6 Sortin2 altera la localización subcelular de PIN2 en plantas germinadas en tratamientos con el químico. ....	41
3.7 Sortin2 altera la localización polar de PIN2 en plantas de 7 días tratadas con Sortin2 .....	43
3.8 Sortin2 localiza a PIN2 en compartimentos intracelulares en plantas de 7 días tratadas con Sortin2 .....	45



3.9 Tratamientos con oscuridad, al igual que Sortin2, localizan a PIN2 en compartimentos intracelulares .....	47
3.10 Sortin2 induce localización de PIN2 en compartimentos intracelulares de bajo tamaño en plantas de 7 días tratadas con Sortin2.....	49
3.11 Sortin2 induce la deslocalización de PIN1 en plantas germinadas en los tratamientos con el químico.....	52
3.12 Sortin2 altera la localización de la proteína receptora de brasinosteroides BRI1.....	55
DISCUSIÓN .....	57
4.1 Sortin2 genera particulares fenotipos en <i>A. thaliana</i> .....	57
4.2 Sortin2 inhibe la respuesta a auxina. ....	60
4.3 Localización de facilitadores de eflujo PIN1 y PIN2 .....	62
CONCLUSIÓN .....	66
BIBLIOGRAFÍA .....	67



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema con antecedentes actuales del modelo quimiosmótico.....	4
Figura 2. Localización de los distintas proteínas facilitadoras de la familia PIN....	6
Figura 3. Esquema de la estrategia usada para el análisis de la respuesta a auxina.....	14 y 15
Figura 4. Sortin2 genera particulares fenotipos en <i>A. thaliana</i> .....	24 y 25
Figura 5. Sortin2 inhibe la respuesta a IAA, determinado mediante el ensayo histoquímico GUS.....	28
Figura 6. La cinética de la hidrólisis de MU a MUG, catalizada por la enzima $\beta$ -glucoronidasa, es lineal al menos hasta los 30 minutos de reacción.....	30
Figura 7. Sortin2 inhibe completamente la respuesta a IAA, medido mediante ensayo cuantitativo.....	32
Figura 8. Sortin2 inhibe la respuesta a las auxinas IAA, NAA y 2,4-D.....	34
Figura 9. La localización polar de los facilitadores de auxina es más notoria en algunos planos focales.....	38, 39 y 40
Figura 10. Sortin2 altera la localización subcelular de PIN2 y la orientación en la división celular.....	42
Figura 11. Sortin2 altera la localización polarizada de PIN2 en la membrana plasmática.....	44
Figura 12. Sortin2 localiza al facilitador de auxina PIN2 en compartimentos intracelulares de gran tamaño.....	46
Figura 13. Tratamientos con 4 horas de oscuridad inducen localización del facilitador de auxina PIN2 en compartimentos intracelulares de gran tamaño.....	48



Figura 14. Sortin2 localiza al facilitador de auxina PIN2 en compartimentos intracelulares de tamaño similar al de endosomas.....	50 y 51
Figura 15. Sortin2 altera la localización de PIN1.....	53 y 54
Figura 16. Sortin2 altera la localización de la proteína receptora de brasinosteroides BRI1.....	56
Figura 17. Estructura química de Sortin2.....	59
Figura 18. Modelo propuesto del mecanismo de acción de Sortin2.....	65



## ABREVIATURAS

- BRI1 : Receptor de brasinosteroides
- CPY : Carboxipeptidasa Y
- DMSO : Dimetilsulfóxido
- EDTA : Ácido etilen-diamino-tetra-acético
- GFP : Proteína fluorescente verde
- GUS :  $\beta$ -glucoronidasa
- IAA : ácido 3-indol acético
- MS : Medio basal de crecimiento Murashige and Skoog
- MU : 4-metil-umbeliferona
- MUG : 4-metil-umbeliferil-b-D-galactosa
- NAA : ácido 1-naftaleno acético
- PAT : Transporte polarizado de Auxinas
- SDS : Sodio-dodecilsulfato
- SE : Sistema de endomembranas
- S2 : Sortin2
- TX-100: Triton X-100
- X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico
- 2,4-D : 2,4-diclorofenoxiacético
- PIN1 y PN2: Facilitadores de salida (eflujo) de auxina

## RESUMEN

Las plantas se caracterizan por su flexibilidad fenotípica, como estrategia de sobrevivencia, requiriendo apropiados cambios fisiológicos que están regulados por moléculas señalizadoras llamadas hormonas. Las hormonas auxinas han sido implicadas en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas además de la respuesta a estímulos del medio ambiente. El correcto transporte polarizado de las auxinas (PAT) ha sido considerado crucial para un correcto desarrollo de la planta, y su funcionamiento se basa en la localización polar de los facilitadores de auxina. Para que los facilitadores presenten una ubicación polar en la célula, se requiere del activo y correcto funcionamiento del Sistema de endomembranas (SE).

Sortin2 es un compuesto químico sintético identificado en investigaciones de genómica química por su actividad biológica en levaduras y plantas (Zouhar y col, 2004, Norambuena y col 2008). Sortin2 induce la secreción de la proteína destinada a vacuola (CPY), en levaduras y en plantas, y además altera la biogénesis de la vacuola en plantas, ambos mecanismos en los que componentes de la vía secretoria del SE tienen un papel relevante.

Los resultados de este seminario de título indican que Sortin2 provoca fenotipos en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con Sortin2 similares a los encontrados bajo tratamientos con inhibidores de PAT. Aquí se muestra que Sortin2, en efecto, inhibe completamente la respuesta a auxinas sintéticas y naturales. También altera la localización del receptor de brasinosteroides BRI1, lo que indicaría que talvez otras vías de señalización, además de auxina, están siendo afectadas.

Se observó también la alteración que Sortin2 provoca sobre la localización, crucial para PAT, de los facilitadores de eflujo PIN1 y PIN2. Sortin2 induce acumulación de PIN2, en compartimentos que se asemejan a vacuola, al igual que tratamientos con oscuridad, sugiriendo que el blanco celular de Sortin2 se encuentra en componentes del tráfico vesicular endocítico. Sortin2 también provoca fenotipos subcelulares en donde se observa localización no polarizada del facilitador PIN2 indicando que talvez el reciclaje endocítico polarizado tratado extensamente por Dhonukshe, y col., 2008, esta siendo alterado.

Antecedentes previos señalan el efecto de Sortin2 en la ruta secretoria del SE. En este seminario se presenta evidencia que sugiere una alteración de la via endocítica. Por lo tanto Sortin2 podría alterar a mecanismos compartidos entre estas dos vías, lo que posicionaría a Sortin2 como una poderosa herramienta para estudiar mecanismos de biología celular vegetal, ya que afectaría compartimentos que ninguna otra droga conocida altera.

## ABSTRACT

Plants are characterized by their phenotypic flexibility, as a strategy for survival, requiring appropriate physiological changes that are regulated by small signaling molecules called hormones. Auxin hormones have been implicated in almost every growth and developmental aspects as well as the response to environmental stimuli. The appropriate polarized auxin transport (PAT) has been considered crucial for the proper plant development. Its operation is based on the auxin carrier polar localization. An undisrupted endomembrane system is required for a successful auxin carrier polar localization.

Sortin2 is a synthetic chemical compound identified under chemical genomics research due its biological activity in yeast and plants (Zouhar *et al*, 2004; Norambuena *et al*, 2008). Sortin2 induces, in yeast and plants, the secretion of the vacuole sorting protein CPY. It also alters vacuole biogenesis in plants. Both mechanisms are determined by the secretory pathway components of the endomembrane system (ES)

In this work it is shown that Sortin2 produces particular phenotypes in *Arabidopsis thaliana* when they are treated with Sortin2, similarly than what is found under PAT inhibitors treatments. Here it is shown that Sotin2 completely inhibits both synthetic and natural auxin responsiveness. Sortin2 also alters the brassinosteroids receptor BRI1 localization, which indicates that there might be others signaling pathways affected due to Sortin2.

It was observed also that Sortin2 alters auxin carriers, PIN1 and PIN2, localization, which is crucial to PAT. Sortin2 induces accumulation of PIN2, in compartments that are similar to vacuole, as treatments with darkness, suggesting that

the cellular target of Sortin2 is in components of the endocytic vesicle traffic. Sortin2 also provokes subcellular phenotypes in where it is observed a non polarized localization of the facilitator PIN2 indicating that the polarized endocytic recycling reviewed extensively by Dhonukshe, et al., 2008, might be altered.

Previous knowledge indicates that Sortin2 disrupts the secretory route of ES. In this seminar evidence is presented that suggests an alteration of the endocytic pathway. Therefore Sortin2 might be altering the mechanisms shared between these two routes, which would define Sortin2 as a powerful tool for the study of mechanisms of cellular plant biology, since it would affect compartments that no other known drug alters.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Auxinas en el desarrollo de plantas

Las estrategias de sobrevivencia que adquirieron animales y plantas durante la evolución son uno de los principales aspectos que los diferencian. Las plantas evolucionaron hacia la tolerancia fisiológica y una mayor plasticidad fenotípica, mientras que los animales adquirieron elaboradas capacidades sensoriales y de locomoción. Es fácil de evidenciar estas diferencias evolutivas al analizar el establecimiento de su arquitectura corporal. Los animales definen su forma adulta tempranamente en su desarrollo. Las plantas, en cambio, sólo bosquejan su plan corporal al comienzo de su desarrollo para dejar a un complejo desarrollo postembrionario, basado en la mantención de una gran población de células troncales, determinar los detalles de la estructura corporal. Con esto, las plantas pueden regular sus tasas de crecimiento, formar nuevos órganos postembrionariamente y tener una alta capacidad de regeneración (Weigel y Jurgens, 2002).

La flexibilidad fenotípica de las plantas es una consecuencia de apropiados cambios fisiológicos. Muchos de estos procesos se encuentran regulados por moléculas señalizadoras llamadas hormonas. Dentro de las primeras hormonas caracterizadas y más estudiadas encontramos a la auxina. Auxina juega un rol primordial en muchos procesos fisiológicos en plantas como la polaridad, el desarrollo embrionario y del fruto, organogénesis, diferenciación tisular vascular, tropismo, formación del gancho del hipocótilo y dominancia apical (Paciorek y Friml, 2006; Rashotte y col, 2000). En general, las auxinas han sido implicadas en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas. La auxina más importante en plantas

es el ácido 3-indol acético (IAA) y es mucho más potente que otras hormonas naturales como son el ácido fenil acético (PAA) y el ácido 3-indolbutírico (IBA). Dentro de las auxinas sintéticas más usadas se encuentran 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 1-naftaleno acético (NAA) (Delker y col., 2008).

Para promover cambios durante el desarrollo, la hormona vegetal auxina provoca una referencia espacial y temporal, mediante su acumulación local en determinadas células (Friml y col., 2003). Aunque se ha identificado recientemente que una parte importante del movimiento de estas hormonas a través de la planta es mediante el sistema vascular, el transporte de estas hormonas a nivel de tejido no vascular es el de mayor relevancia fisiológica (Taiz y Zeiger, 2006). Las auxinas viajan a través de los tejidos mediante el llamado sistema de transporte polar célula a célula (Polar Auxin Transport, PAT) que utiliza proteínas facilitadoras de auxina ubicadas en las membrana plasmática.

Estudios moleculares, genéticos y bioquímicos han dilucidado muchos aspectos de la señalización de auxinas (Guilfoyle y col., 1998). El modelo actual de la señalización de auxinas sugiere que reguladores negativos como las proteínas denominadas auxina/ácido 3-indol acético (Aux/IAA) son degradados de manera dependiente de auxina. Al degradar a las proteínas Aux/IAA se libera la represión sobre una red de genes que responden a estas hormonas y que guían un apropiado desarrollo y crecimiento de la planta (Zhao y col., 2003).

## 1.2 Polaridad en plantas

El término polaridad se ocupó en plantas en 1878 por primera vez cuando se demostró que raíces y tallos crecieron en lugares específicos independientemente de la posición con respecto a la gravedad. Estos fenómenos son el reflejo de la polaridad celular que es una de las propiedades fundamentales de los organismos multicelulares. Gran parte de la flexibilidad de plantas durante su desarrollo está dada por la mayor capacidad de redefinir su polaridad celular y tisular comparado con otros organismos multicelulares. La hormona auxina ha sido identificada como uno de los principales factores involucrados en el gatillamiento de estos cambios (Taiz y Zeiger, 2006). A su vez, el correcto transporte polarizado de las auxinas ha sido considerado ser crucial en el correcto establecimiento de la polaridad del organismo (Feraru y Friml, 2008). Uno de los avances más importantes en la biología de las auxinas fue el planteamiento del modelo quimiosmótico (figura 1) que plantea al menos dos ideas principales. La primera, propone la existencia de proteínas facilitadoras para el ingreso de auxina, localizadas en la membrana plasmática. La segunda, predice la localización asimétrica de estos facilitadores hacia una cara de las células transportadoras determinando así el sentido del flujo de la auxina. Ambas propuestas han sido verificadas experimentalmente a nivel tisular y celular (Wisniewska y col., 2006; Vieten y col., 2007; Petrásek y col., 2006). A nivel de células individuales, la polaridad está determinada por la distribución asimétrica de componentes intracelulares que forman dominios funcionales o simplemente morfológicos (Kleine-Vehn y Friml, 2008). De acuerdo a lo establecido por el modelo quimiosmótico, es la polaridad a nivel celular la que determina la direccionalidad en el flujo de auxinas y como consecuencia, determina la polaridad a nivel del organismo.

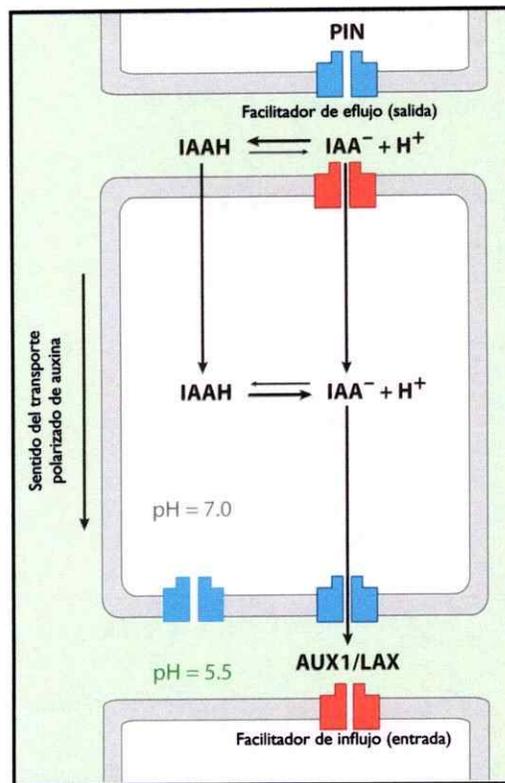
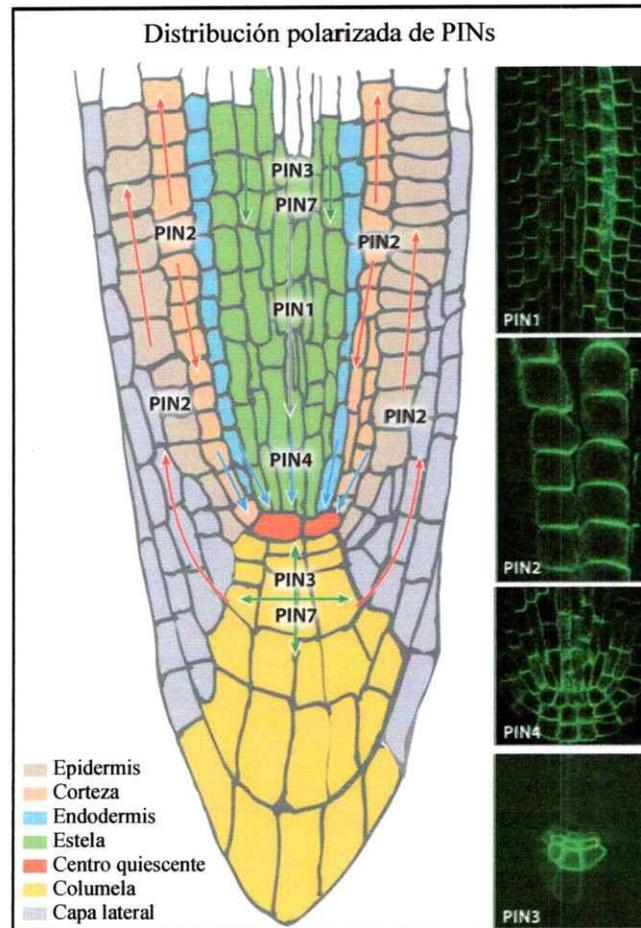


Figura 1. **Esquema con antecedentes actuales del modelo quimiosmótico para el transporte de auxina.** El esquema se basa en lo postulado por Rubery y Shaldrake, 1974. El modelo, muy adelantado para la época, postula que el transporte de auxinas se realiza célula a célula ayudado por proteínas facilitadoras ubicadas en la membrana plasmática. Ahora se conoce cuáles son varios de los miembros de la familia de facilitadores de auxina, tanto de entrada a la célula (influjo) como de salida desde ésta (eflujo). Adaptado desde Kleine-Vehn y Friml, 2008.

Los componentes intracelulares que determinan la polaridad a nivel celular son las proteínas que facilitan el influjo de auxina, desde el apoplasto hacia el interior celular, como las proteínas AUX1 (Bennett y col., 1996) y PGP (Swarup y col., 2008), así como los facilitadores que median la salida de la hormona desde el interior de la célula, como lo son la familia de proteínas PIN constituida por 8 miembros (Petrásek y col., 2006).

Las proteínas PIN se encuentran localizadas en la membrana plasmática y poseen una localización polarizada, lo que es un determinante primordial en el flujo de auxina (Wisniewska, y col., 2006). Su localización polarizada es crucial en diversos procesos incluyendo aquellos relacionados con el desarrollo embrionario (Feraru y Friml, 2008). Su localización, además, varía según el estado de desarrollo de la planta. En la figura 2 encontramos un esquema de la localización que se ha descrito para varias de las proteínas PIN en raíces, en donde se ha estudiado intensamente a estas proteínas. Post-embrionariamente, PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7, se localizan en la cara basal (hacia la punta de la raíz) de células de la estela y vasculatura de la raíz, mientras que PIN2 se localiza apicalmente (la cara ubicada hacia la parte aérea de la planta) en células de la epidermis y de la capa protectora lateral de la raíz. PIN2 también ha sido localizado en la cara celular basal, pero en las células jóvenes de la corteza.



**Figura 2. Localización de los distintas proteínas facilitadoras de la familia PIN.** Cada miembro de esta familia tiene una localización particular en los distintos tejidos que se distinguen en la raíz. Existe una correlación entre la localización de estos facilitadores y el sentido de flujo de la auxina. Su localización es apical en los tejidos donde el flujo de auxinas es ascendente (flechas rojas hacia arriba) y basal en aquellas células donde las auxinas se translocan descendientemente (flechas rojas hacia abajo). Adaptado desde Kleine-Vehn y Friml, 2008.

### 1.3 Sistema de endomembranas en plantas

En los últimos años se le ha adjudicado al sistema de endomembranas (SE) en plantas una importante participación en procesos como señalización de hormonas auxina, brasinosteroides y ácido abscísico, desarrollo, tropismo, y hasta mecanismos de defensa al ataque de patógenos (Surpín y Raikhel, 2004).

Respecto a la señalización de auxina, se ha descrito una directa relación con la ruta secretoria. Esta relación se explicaría principalmente por el papel que cumple el SE en el transporte célula a célula de la auxina. PAT es crucial para un correcto desarrollo de la planta, y su funcionamiento se basa en la localización polar de los facilitadores de auxina (arriba descritos). Para que los facilitadores presenten una ubicación polar en la célula, se requiere del activo y correcto funcionamiento del SE.

El SE en plantas se puede dividir funcionalmente en las rutas secretorias y endocíticas. Ambas rutas son esenciales, para el tráfico desde y hacia la membrana y pared celular. A través de la vía secretoria, nuevas proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) y luego destinadas a diferentes compartimentos tales como aparato de golgi, sistema endosomal, membrana plasmática, vacuola, pared celular y espacio extracelular. En el tráfico endocítico, componentes de pared y membrana plasmática, son reciclados a compartimentos endosomales (Samaj y col., 2004) e incluso pueden ser destinados a vacuola (Laxmi y col., 2008). En general, la morfología, localización y funcionamiento de los compartimentos de endomembranas son altamente dinámicos y su regulación es vital para la planta.

El mecanismo de destinación polar de las proteínas PIN utiliza componentes de SE para llevarse a cabo en dos pasos. En un primer paso los facilitadores de destinan

de una manera no polarizada, a toda la membrana plasmática, a través de la ruta secretoria. La polaridad basal-apical de estas proteínas se establece posteriormente, mediante la ruta endocítica. El reciclaje endocítico polarizado, mecanismo recientemente descrito (Dhonukshe y col., 2008) usa compartimientos endosomales como intermediarios del tráfico desde todas las caras del límite celular hacia sólo alguna de ellas, para llevar a cabo una localización polarizada (Geldner y col., 2001).

#### **1.4 Sortin2 y sus efectos en *A. thaliana***

Como se mencionó en las secciones 1.1 y 1.2 la hormona auxina ha sido identificada como un importante factor que media la polaridad de la planta y lo hace principalmente a través de un correcto flujo por sus tejidos. Por otro lado, la adecuada localización celular de los facilitadores de auxina es fundamental para este correcto flujo y, como se ha señalado antes, esta localización, está mediada por un adecuado tráfico vesicular. Esto genera una interesante relación entre los fenómenos de gravitropismo y señalización de auxinas con el transporte polarizado de estas hormonas y el tráfico vesicular en el SE que permite que este transporte funcione.

Sortin2 es un compuesto químico sintético de baja masa molecular que causa la alteración del SE en levaduras (Norambuena y col., 2008). Sortin2 se identificó en una investigación en el área de la genómica química, en donde se analizaron cerca de 4.800 compuestos en busca de aquellos que causaran la secreción de una proteína localizada en la vacuola, carboxipeptidasa (CPY), hacia el medio extracelular en levaduras. Catorce de los compuestos identificados lograron alterar la destinación normal de CPY hacia la vacuola y disponerla en el medio extracelular. Sortin2 es uno de estos 14 compuestos que además, es bioactivo en la planta *Arabidopsis thaliana*.

Plántulas de *Arabidopsis* germinadas en altas concentraciones de Sortin2 presentan raíces muy cortas (Zouhar y col., 2004). A nivel celular este compuesto altera la morfología de la vacuola y causa la secreción de la proteína CPY de *Arabidopsis* en raíces e hipocótilo (Zouhar y col., 2004; Norambuena y col., resultados no publicados). Análisis realizados en *Arabidopsis* y *Nicotiana tabacum* (tabaco), demuestran que Sortin2 inhibe la germinación del polen y altera la polaridad de la elongación del tubo polínico (Norambuena y col., resultados no publicados). Resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que Sortin2 altera la respuesta a la hormona auxina, ya que inhibe el aumento de raíces laterales y pelos radiculares en raíces de *Arabidopsis*. Ambos fenotipos están fuertemente ligados a la hormona auxina (Rahman y col., 2002). La inhibición de la respuesta fisiológica de la planta a auxina podría ser causado por la alteración que Sortin2 produce a nivel celular en el sistema de endomembranas.

Todos los antecedentes mencionados posicionan a Sortin2 como un compuesto muy interesante de estudiar, ya que los fenotipos que tratamientos con este químico producen, poseen una estrecha relación con el SE y el establecimiento de polaridad celular.

## Hipótesis

Sortin2 afectaría la señalización de auxina al alterar la correcta localización de las proteínas facilitadoras del transporte de auxina.

## Objetivos

### General

Caracterizar el efecto de Sortin2 en *Arabidopsis thaliana* analizando la alteración en la respuesta a auxinas y la localización de las proteínas facilitadores de su transporte.

### Específicos

- 1.- Describir fenotípicamente la alteración por Sortin2 en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
- 2.- Analizar el efecto de Sortin2 en la respuesta a auxinas en plantas de *A. thaliana* mediante un sistema reportero génico.
- 3.- Evaluar la alteración, por efecto de Sortin2, de la localización de facilitadores de auxina, en raíces de *Arabidopsis thaliana*

## MÉTODOS

### 2.1 Esterilización de semillas

*Arabidopsis thaliana* fue el modelo de estudio para todos los experimentos realizados en este seminario de título. Las ventajas de usar esta planta como modelo han sido ampliamente discutidas en la literatura científica (Leonelli, 2007). Las semillas de todas las líneas usadas fueron esterilizadas previamente a su uso mediante protocolo estándar. El protocolo de esterilización consiste en los siguientes pasos: 1) lavar las semillas (300-600) con 1 mL de etanol 95% v/v (calidad analítica) durante 5 minutos en agitación moderada. 2) luego incubar las semillas con 1 mL de solución etanol 70% v/v - TX100 0,1% v/v por 15 minutos en agitación moderada. 3) lavar con 1mL de agua estéril 5 veces, agitando brevemente entre cada lavado 4) guardar las semillas en 1 mL de agua estéril a 4°C en oscuridad durante al menos 48 horas antes de usar, con el objeto de estratificar las semillas antes de ser sometidas a los tratamientos.

### 2.2 Cultivo de plantas

Se sembraban semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre ecotipo Col0, de las líneas transgénicas marcadoras de los facilitadores de auxina: PIN1:GFP ó PIN2:GFP y de la línea con el sistema reportero génico DR5:GUS en medio sólido de cultivo (MC) de plantas (Medio de cultivo de planta Murashige y Skoog 0,44% m/v, sacarosa 2% m/v, fitoagar 0,7% m/v, 0,01% mioinositol m/v, MES 0,05% m/v, en pH 5.7) en placas de cultivo de plantas.

Las placas fueron dispuestas verticalmente para que las plántulas crecieran en la superficie del medio de cultivo. Este tipo de metodología es recomendado cuando las

plántulas van a ser manipuladas durante los tratamientos, ya que permite traspasar la plántula de un medio a otro sin provocar mayor daño o deterioro. Todas las plántulas fueron cultivadas en condiciones estándares de crecimiento (22 °C y 16 horas de fotoperíodo y a una intensidad luminosa de 18000 lux).

### **2.3 Tratamientos con Sortin2**

Se preparaban soluciones de trabajo (ST) de Sortin2 100X. Las ST se diluyeron 100 veces en el medio de cultivo líquido. Así, el medio contiene la concentración de Sortin2 deseada. Sortin2 está disuelto en DMSO 100%, por lo que el medio de cultivo contiene una concentración final 1% v/v de DMSO que no afecta el desarrollo de las plantas (Zohuar y col, 2004). Por esto último, la condición control, para todos los análisis de los efectos de Sortin2, es medio de cultivo de plantas con DMSO 1%.

### **2.4 Tratamientos con hormonas auxinas**

Las placas de tratamiento de hormonas auxinas se preparan disolviendo las hormonas en el medio de cultivo. La auxinas usadas fueron la auxina natural ácido 3-indol acético (IAA) y auxinas sintéticas, 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 1-naftaleno acético (NAA).

Para los tratamientos con IAA se preparaba una solución stock 100 mM disuelto en etanol. Se diluye posteriormente en agua hasta 1 mM y se diluye 100 veces en el medio de cultivo, logrando una concentración final de 10  $\mu$ M. Para los tratamientos con NAA 1  $\mu$ M se prepara NAA 100  $\mu$ M disuelto en agua y se diluye 100 veces en el medio de cultivo. Finalmente, para los tratamientos con la auxina 2,4-D, se preparó una solución de 2,4-D 100  $\mu$ M en agua y se diluyó 200 veces en medio de cultivo generando una concentración final de 0,5  $\mu$ M.

## 2.5 Tratamiento de oscuridad

Plántulas de la línea transgénica PIN2:GFP fueron crecidas por 7 días en MC y luego envueltas, durante 4 ó 24 horas, en papel aislante de la luz y dispuestas durante el tratamiento a las mismas condiciones de luz y temperatura que fueron expuestas durante el cultivo.

## 2.6 Análisis de la morfología de *A. thaliana*

Para analizar la morfología de las plántulas cuando son germinadas en Sortin2 se sembraron semillas de *A. thaliana* ecotipo Col0, pero en medios que contenían Sortin2 a distintas concentraciones. Se usó medio de cultivo con Sortin2 a las siguientes concentraciones finales: 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL y 75 µg/mL.

Después de 7 días desde la siembra se fotografiaron las plántulas crecidas en los distintos tratamientos. Se fotografió usando una lupa Olympus MVX10 asociada a una cámara Leica MVX TV1XC aumentando la imagen 6.3 veces (1x0,63x10). Las imágenes fueron luego procesadas con el programa computacional Macnification 1.5.1 (Orbicule® 2008).

## 2.7 Análisis de la respuesta a auxinas

Para la determinación de los niveles de respuesta a auxina que se producen en distintos tratamientos se usó la línea transgénica DR5:GUS. Esta línea contiene el promotor DR5 fusionada a GUS que codifica para la enzima β-glucoronidasa. El promotor DR5 fue modificado genéticamente para mejorar su respuesta a auxina (Ulmasov, 1997).

Semillas de *A. thaliana* de la línea transgénica DR5:GUS fueron sembradas en MC sólido e incubadas por 7 días generando plántulas de aproximadamente 2 cm de longitud. Las plántulas eran luego trasladadas durante un periodo de 24 horas a placas de tratamientos (figura 3B). Las placas de tratamiento son MC sólido que contiene una concentración final de: DMSO 1% (A1), Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A2), IAA 10  $\mu\text{M}$  (A3), IAA 10  $\mu\text{M}$  y Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A4) (figura 3B)

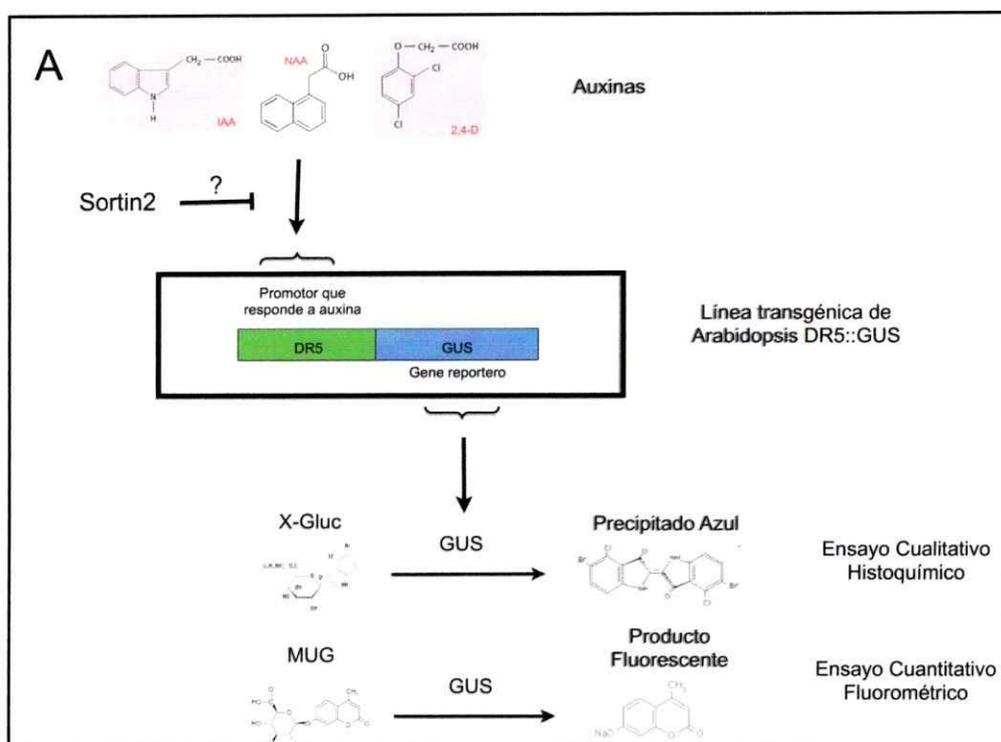
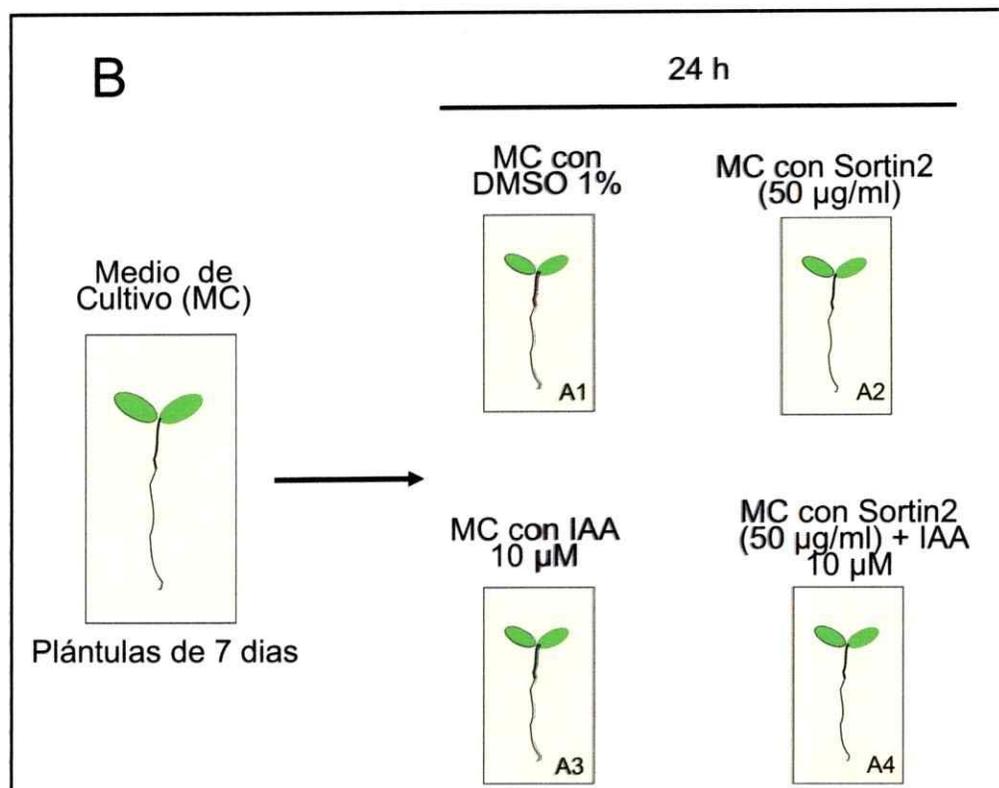


Figura 3. **A, Esquema de la estrategia usada para el análisis de la respuesta a auxina.** Las auxinas ácido 3-indol acético (IAA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 1-naftaleno acético (NAA) activan al promotor DR5. Este promotor dirige la transcripción del gen GUS. La enzima codificada por GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) tiene la capacidad de modificar a los sustratos X-Gluc y MUG. Cuando X-Gluc es modificado se genera un precipitado azul que permite identificar dónde está siendo transcrito el gen GUS. Cuando MUG es hidrolizado se forma un producto fluorescente que nos permite cuantificar los niveles de transcripción del gen GUS.



**Figura 3. B, Esquema de la metodología usada.** Plántulas de *A. thaliana* fueron sembradas en medio de cultivo sólido (MC) de plantas y luego trasladadas a: MC con DMSO 1% (A1), MC con Sortin2 50 µg/mL (A2), MC con IAA 10 µM (A3), MC con IAA 10 µM y Sotin2 50µg/mL (A4). En el ensayo fluorométrico se analizaron también las hormonas 2,4-D y NAA.

### 2.7.1 Ensayo histoquímico

La enzima  $\beta$ -glucoronidasa tiene la capacidad de modificar al compuesto X-Gluc y formar ácido glucurónico incoloro y un segundo producto insoluble y coloreado (figura 3A).

Luego del tratamiento, las plántulas son cuidadosamente trasladadas a placas con 2 mL de la solución reveladora que contiene el sustrato X-gluc (X-gluc 1mg/mL, tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 7, EDTA 10 mM pH 8, TX-100 0,1% v/v, K-ferricianida 2 mM, K-ferrocianida 2 mM) (figura 3A).

Para promover la entrada del sustrato X-Gluc al tejido se somete las placas a vacío (15 Pa) por 15 minutos. Posteriormente se incuban las placas durante 48 horas a 37°C. Se detiene la reacción retirando la solución de sustrato y reemplazándola por etanol 70% agitando por 30 minutos con el objetivo de aclarar el tejido y permitir observar de mejor manera la coloración. Finalmente, las fotografías fueron tomadas con cámara comercial Canon de 8 Mpx. Las imágenes fueron luego procesadas usando utilizando el programa computacional Macnification 1.5.1 (Orbicule® 2008)

### 2.7.2 Ensayo fluorométrico

Para cuantificar la activación transcripcional del gen GUS se usó la propiedad, de la enzima que codifica, de hidrolizar un sustrato comercial generando un producto fluorescente (figura 3A). El sustrato es un análogo a X-Gluc y su nombre químico es 4-metil-umbeliferil-b-D-galactosa (MUG). El producto fluorescente que genera es 4-metil-umbeliferona (MU) (Fior y col, 2009).

En el ensayo fluorométrico se usaron, además de IAA, dos auxinas sintéticas. Estas auxinas también actúan como activadores del sistema reportero DR5::GUS. Las

3 auxinas utilizadas en el ensayo fluorométrico fueron: ácido 3-indol acético (IAA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 1-naftaleno acético (NAA) (ver introducción). Cada una de las nuevas hormonas implica dos nuevas condiciones de tratamiento; medio de cultivo con hormona y medio de cultivo con hormona y Sortin2. Las concentraciones finales para cada uno de los tratamientos con cada una de las hormonas fueron: 10  $\mu\text{M}$  para IAA, 1  $\mu\text{M}$  para NAA y 0,5  $\mu\text{M}$  para 2,4-D. Se usaron distintas concentraciones debido a las diferentes potencias activadoras que estas hormonas poseen. Estas concentraciones son las usadas por los investigadores del área para este tipo de experimentos.

Los tratamientos realizados fueron: MC con DMSO 1%, MC con Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MC con IAA 10  $\mu\text{M}$ . MC con IAA 10  $\mu\text{M}$  y Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MC con NAA 1  $\mu\text{M}$ , MC con NAA 1  $\mu\text{M}$  y Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MC con 2,4-D 0,5  $\mu\text{M}$ , y por último, MC con 2,4-D 0,5  $\mu\text{M}$  y Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se recolectó aproximadamente 14 mg de tejido vegetal desde aquellas plántulas (6-8 unidades) sometidas a los tratamientos, las que fueron depositadas en tubos y congeladas con nitrógeno líquido. Se agregó a cada tubo 100  $\mu\text{L}$  del buffer de extracción (BE) de proteínas totales (tampón de fosfato de sodio pH 7,1 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1 % v/v, SDS 0,1 % m/v, DTT 5 mM). Se molió el tejido usando pistilos de homogenización y luego se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm a 4° C. El sobrenadante era transferido a nuevos tubos y mantenido en refrigeración a -80 ° C hasta su uso.

La reacción enzimática se realizó utilizando el protocolo adaptado de Jefferson y col., 1987 en placas de microtitulación de 96 pocillos. La reacción se llevo a cabo en el BE con un volumen total de 250  $\mu\text{L}$  y usando 12  $\mu\text{L}$  del extracto de proteínas. La concentración del sustrato MUG fue de 1 mM. La reacción se incubó a 37° C. Para

detener la reacción se tomó 50  $\mu$ L de la reacción y se depositaron en 200  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio 0,2 M. La reacción se detiene por el brusco cambio de pH que produce la solución de carbonato de sodio. La reacción se detuvo a los 0, 5, 15 y 30 minutos desde comenzada la reacción.

La fluorescencia se midió usando el filtro de excitación 360/40 nm y capturando la emisión con el filtro 440/30 nm, utilizando el fluorímetro lector de placas de microtitulación BioTek Synergy2®.

La cuantificación de proteínas totales de los extractos se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (Pierce, Inc). Este método se basa en reducción del ión cúprico a cuproso provocado por proteínas (reacción de Biuret), unido a una detección colorimétrica, ya que la unión del catión cuproso con el ácido bicinonínico genera un producto de coloración púrpura.

Los resultados de las actividades enzimáticas fueron corregidos por la cantidad de proteína total presente en la muestra. Para esto, se dividió las unidades de fluorescencia obtenidas en cada reacción por la masa de proteínas totales en cada ensayo.

Los datos fueron, procesados graficados y analizados estadísticamente con el programa computacional Graphpad Prism 5.0®. El análisis estadístico que se aplicó fue ANOVA de dos vías con un  $n$  mínimo de 4 y un  $P < 0,05$ .

## 2.8 Análisis de la localización subcelular de los facilitadores de auxinas y de la proteína de membrana BRI1

Para el análisis de la localización subcelular de los marcadores se usó microscopía confocal. Se comparó la ubicación de los marcadores en plántulas que fueron sometidas a tratamientos con Sortin2 con aquellas que recibieron tratamiento control. El tratamiento control es medio de cultivo que contiene DMSO 1%.

Las observaciones se realizaron en la punta de la raíz de las plántulas, enfocando el tipo celular (estela, endodermis, corteza, epidermis, cubierta lateral o columela) dependiendo del marcador utilizado. PIN2:GFP se observó en epidermis y corteza, que son las capas celulares de la raíz donde se ha descrito su localización de tipo basal o apical dependiendo de la capa celular a observar. En el caso de PIN1:GFP se observó, en cambio, las células de la estela donde está descrita su localización basal.

Las concentraciones finales de Sortin2 usadas fueron: 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL. Usando estas concentraciones se hicieron dos tipos de tratamientos:

1. *Plántulas germinadas en las placas de tratamientos.* Plántulas de 7 días de las líneas marcadoras PIN2:GFP y PIN1:GFP fueron obtenidas según detalles descritos en la sección cultivo de plantas.

2. *Plántulas de 7 días trasladadas a placas de tratamiento.* Plántulas de 7 días de las líneas marcadoras PIN2:GFP y PIN1:GFP fueron trasladadas a placas de tratamiento por periodos 6, 24 ó 48 hrs.

Se usó el microscopio confocal Zeiss LSM 510. Se capturó la fluorescencia de la proteína GFP en el rango 505-550 nm y se excitó usando el láser de 488 nm. El

análisis de las imágenes se realizó con los programas Macnification 1.5.1 (Orbicle® 2008) e Imagej 1.40 (Wayne Rasband, NIH, USA).

## RESULTADOS

### 3.1 Sortin2 altera el crecimiento y el gravitropismo en *A. thaliana*

Para analizar los efectos que Sortin2 provoca sobre el crecimiento de las plantas, se sembraron semillas de *A. thaliana* en medio de cultivo (MC) que contenían concentraciones crecientes del compuesto Sortin2. La condición control corresponde, para todos los experimentos que involucren a Sortin2, a MC con dimetilsulfóxido (DMSO) 1% v/v, ya que es la concentración final de DMSO que poseen los tratamientos con Sortin2. Esta concentración de DMSO no altera el crecimiento normal de las plántulas (Zouhar y col., 2004).

En la figura 4A se evidencia el efecto de Sortin2 sobre el tamaño de las plántulas de 7 días al compararlas con el crecimiento normal que se observa en la condición control. El tamaño de las plántulas germinadas en Sortin2 decrece considerablemente a medida que aumenta la concentración del químico (figura 4A). Esto demuestra la dosis dependencia del efecto de Sortin2 en el crecimiento de las plántulas. La capacidad de modular el efecto provocado por Sortin2 sobre las plantas, es una de las características más ventajosas que se desprenden del uso de compuestos provenientes de investigaciones en genómica química, porque permite estudiar un fenotipo de interés haciendo tratamientos con concentraciones subletales del químico de manera de controlar la severidad del fenotipo.

Las plántulas tratadas con concentraciones menores o iguales a 25 µg/mL de Sortin2 mantienen una clara diferenciación de las estructuras regulares de las plántulas; cotiledones, hipocotilo y raíz. Las estructuras aéreas (hipocotilo y

cotiledones) de estas plántulas permanecen morfológicamente inalteradas a pesar que el tamaño de estas estructuras sí se ve afectado. En las plántulas sometidas a 50 y 75  $\mu\text{g/mL}$  de Sortin2 se observa que la formación de los cotiledones tampoco parece ser alterado por Sortin2.

La raíz de las plántulas sometidas a 25  $\mu\text{g/mL}$  de Sortin2 es notoriamente más pequeña que las que observamos en las plántulas que recibieron los tratamientos con concentraciones menores del químico. A una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ , el químico altera, notoria y principalmente, el largo de la raíz. Las plántulas sometidas a concentraciones mayores de Sortin2 presentan una raíz aún más pequeña que será analizada en la próxima sección.

Es importante destacar que el fenotipo observado en plántulas silvestres (ecotipo Col0) se obtiene también en plántulas de las líneas transgénicas que son utilizadas en los resultados descritos en la sección 3.5 hasta la sección 3.11. Esto indica que el fenotipo causado por Sortin2 no depende del reservorio genético de las plantas.

En la figura 4A se aprecia también la presencia de plántulas que, al ser tratadas con Sortin2, no se orientan con respecto al vector de gravedad (flechas negras). Esta alteración provocada por Sortin2 sólo se aprecia usando concentraciones iguales ó mayores a 25  $\mu\text{g/mL}$ . En el inserto de la fotografía a la condición 25  $\mu\text{g/mL}$  se observan plántulas que crecieron en el sentido completamente opuesto al esperado, obteniendo diferencias en la orientación de crecimiento de las plántulas de hasta  $180^\circ$  respecto al vector de gravedad ( $\vec{g} \downarrow$ ). Esta evidencia sugiere que Sortin2 está afectando de alguna

manera la respuesta gravitrópica, lo que no le permitiría a las plántulas orientarse según el vector de gravedad.

### **3.2 Sortin2 altera la morfología de la raíz de *A. thaliana***

Como se comentó en la sección anterior, Sortin2 afecta mayormente el crecimiento de la raíz. Para analizar en detalle la morfología de la raíz de las plántulas, se les observó utilizando lupa en aumento mayor. La figura 4B muestra en detalle cómo se observa la raíz de una plántula germinada en Sortin2 al séptimo día de cultivo. A 25  $\mu\text{g/mL}$  Sortin2 reduce a la raíz a una estructura con 3 raíces, "tridentada". Esta estructura está compuesta por la raíz principal y por dos raíces más, muy cercanas al hipocotilo, llamadas raíces adventicias. La flecha negra indica la raíz principal ó embrionaria y las flechas rojas señalan el par de raíces adventicias. La formación de esta estructura de raíz no se observó en las plántulas de los tratamientos con Sortin2 50  $\mu\text{g/mL}$ . El fenotipo de raíz que se observa en las plántulas tratadas con Sortin2 50  $\mu\text{g/mL}$ , es mucho más severo, donde la estructura de la raíz está prácticamente ausente. Esto último también se observó en las plántulas germinadas en los tratamientos con Sortin2 75  $\mu\text{g/mL}$ .



Figura 4. **Sortin2 genera particulares fenotipos en *A. thaliana*.** Las plántulas fueron crecidas por 7 días en medio de cultivo que contenía Sortin2. Se usó concentraciones finales del químico desde 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La condición control corresponde a plántulas germinadas en medio de cultivo con DMSO 1%, ya que es la concentración final que alcanza el solvente de Sortin2 en las placas de tratamiento. **A, Sortin2 altera el crecimiento y el gravitropismo de plántulas de *A. thaliana* de 7 días.** Las plántulas germinadas en Sortin2 muestran presencia de cotiledones, pero deterioro o inclusive ausencia de la raíz. Las flechas negras indican los casos más notorios de la pérdida del gravitropismo. Las fotografías fueron tomadas con aumento 6.3X. La dirección y el sentido del vector de gravedad ( $\vec{g} \downarrow$ ) está indicado a la izquierda.

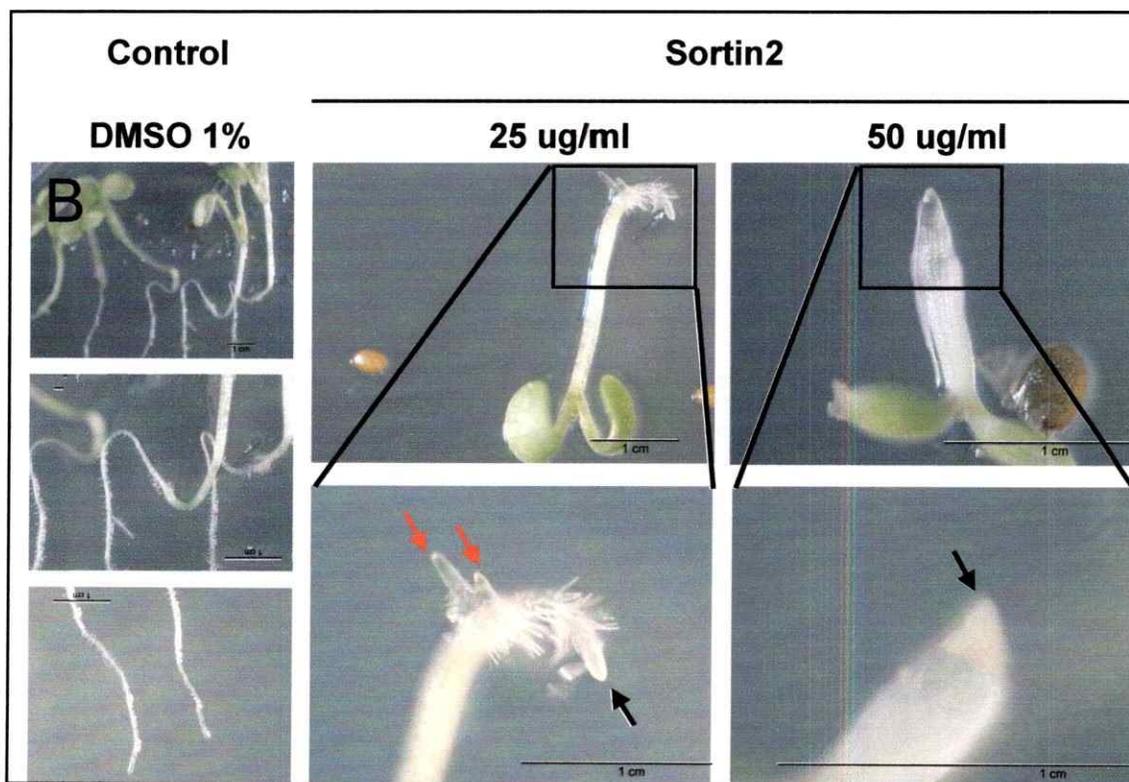


Figura 4. **Sortin2 genera particulares fenotipos en *A. thaliana*.** Las plántulas fueron crecidas por 7 días en medio de cultivo que contenía Sortin2. Se usó concentraciones finales del químico desde 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La condición control corresponde a plántulas germinadas en medio de cultivo con DMSO 1%, ya que es la concentración final que alcanza el solvente de Sortin2 en las placas de tratamiento. **B, Sortin2 altera principalmente la morfología de la raíz.** Fotografías de la estructura de la raíz de plántulas germinadas en MC con Sortin2 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  son dispuestas en aumento menor (arriba) y mayor (abajo). En las raíces sometidas a Sortin2 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se denota una estructura "tridentada" con las flechas coloreadas. En Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  es difícil distinguir la transición entre el hipocótilo y la raíz. En esta fotografía se señala con una flecha negra una zona de coloración más oscura que no se observa en las otras condiciones. Las fotografías de la condición control fueron adquiridas con aumento 6.3X. Para las fotografías de los tratamientos con Sortin2 se usó 32X y 80X de aumento. Todas las barras de tamaño equivalen a 1 cm.

### 3.3 Sortin2 altera la respuesta a la auxina IAA

Las auxinas controlan diversos procesos fisiológicos de las plantas a través de su desarrollo. Como se mencionó en la introducción, a nivel de la planta completa, se sabe que estas hormonas tienen una influencia importante en procesos como la dominancia apical, la iniciación del crecimiento de la raíz y las respuestas trópicas. Los fenotipos observados en la figura 4A y figura 4B, sugieren que Sortin2 podría ejercer su efecto sobre el correcto señalamiento de la hormona auxina.

Para evaluar el efecto de Sortin2 en la respuesta transcripcional gatillada por auxina se utilizó la línea transgénica reportera DR5::GUS (Ulmasov, 1997). Esta línea posee una inserción que contiene una construcción en la que el promotor DR5, que es activado por auxina, dirige la expresión del gen reportero GUS que codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa. DR5 corresponde a una modificación, mediante mutaciones sitio dirigidas, de un promotor aislado desde *Glicine max* (soya) (Ulmasov, 1997). DR5 es altamente activo como promotor lo que permite que la línea DR5::GUS sea un útil y eficiente sistema reportero de la activación transcripcional como respuesta a auxina (Jefferson, 1987).

#### 3.3.1 Ensayo histoquímico

El gen GUS codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa que es capaz de generar un precipitado azul, fácil de visualizar, a partir del sustrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico (X-Gluc). Se usó la actividad enzimática de la proteína GUS como un indicador de la activación del promotor DR5, que se produce debido a la señalización de auxina exógena.

El efecto de Sortin2 en la activación del promotor DR5 es evaluado tratando a plántulas de 7 días durante 24 horas con diferentes tratamientos que permitan dar cuenta de la activación diferencial del promotor DR5.

Los tratamientos se realizan con MC que contiene la auxina ácido indol acético (IAA) a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  y también con MC que contiene una mezcla de auxina 10  $\mu\text{M}$  con Sortin2 a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$ . También se trató a las plántulas con Sortin2 para poder analizar si es que el químico activa al promotor DR5 por sí sólo. Las activaciones obtenidas se comparan con lo obtenido en la condición control.

Estas plántulas tratadas son luego incubadas con una solución reveladora que contiene al sustrato X-Gluc, como se describe en la sección de materiales y métodos.

En la figura 8 se muestran los resultados del ensayo histoquímico para la detección con  $\beta$ -glucuronidasa. El tratamiento con Sortin2 no es capaz de activar al promotor DR5 (A1) como ocurrió cuando las plántulas fueron tratadas con la auxina IAA (A3). Esto indica que Sortin2 no es un compuesto que tenga la propiedad de actuar como auxina. Por el contrario, el promotor DR5 no es activado en el tratamiento con IAA en presencia de Sortin2 (A4), sugiriendo que Sortin2 inhibe la activación que IAA provoca.

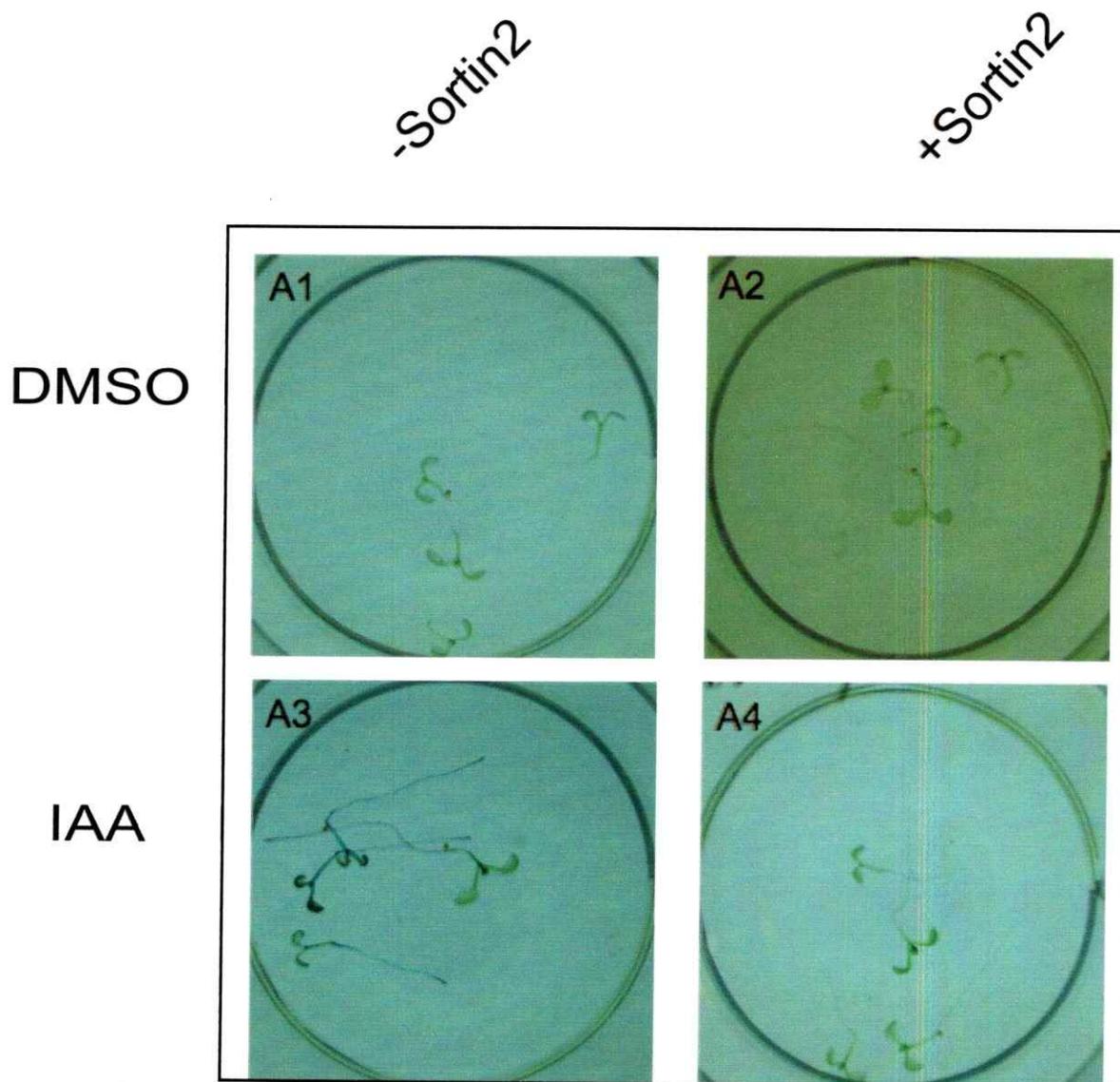


Figura 5. **Sortin2** inhibe la respuesta a IAA, determinado mediante el ensayo histoquímico GUS. Se usó la línea transgénica que contiene al sistema reportero DR5::GUS. Plántulas de 7 días de crecimiento fueron traspasadas a placas de tratamiento (A1-A4) por 24 horas. Luego, las plantas fueron expuestas a la solución reveladora que contiene X-Gluc por 48 horas a 37° C. **A1**, plántulas tratadas en MC con DMSO 1%. **A2**, plántulas tratadas en MC con Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **A3**, tratamientos en MC con IAA 10  $\mu\text{M}$ . **A4**, tratamientos en MC con IAA 10  $\mu\text{M}$  junto con Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3.3.2 Ensayo fluorométrico

Para cuantificar la inhibición de la respuesta a auxina causada por Sortin2, se usó la propiedad de GUS de hidrolizar al sustrato 4-Metil-umbeliferil-b-D-galactosa (MUG) hasta 4-metil-umbeliferona (MU). MU es un producto fluorescente que permite cuantificar la activación del gen reportero en las distintas condiciones de tratamiento. Una mayor cantidad de MU registrado (mayor fluorescencia) es consecuencia de una mayor concentración de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa que a su vez es producto de una mayor activación del sistema reportero DR5::GUS. Los ensayos se hicieron en extracto de proteínas totales de plantas sometidas a los tratamientos con: Sortin2, auxina, y simultáneamente auxina y Sortin2, de la misma manera que los tratamientos para el ensayo histoquímico con X-Gluc (sección 3.3.1)

Con el objetivo de caracterizar las condiciones del ensayo bioquímico se realizó la medición de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa a distintos tiempos de reacción. La cinética de conversión de MUG a MU catalizado por GUS es lineal, al menos, hasta los 30 minutos de reacción como se muestra en la figura 6.

Una vez corroborada la linealidad de la reacción dentro de este periodo de tiempo, se procedió a cuantificar la activación del sistema reportero DR5::GUS sometiendo plántulas de 7 días a los mismos tratamientos usados en el ensayo histoquímico y midiendo la actividad enzimática a los distintos tiempos, al igual que lo descrito en figura 6.

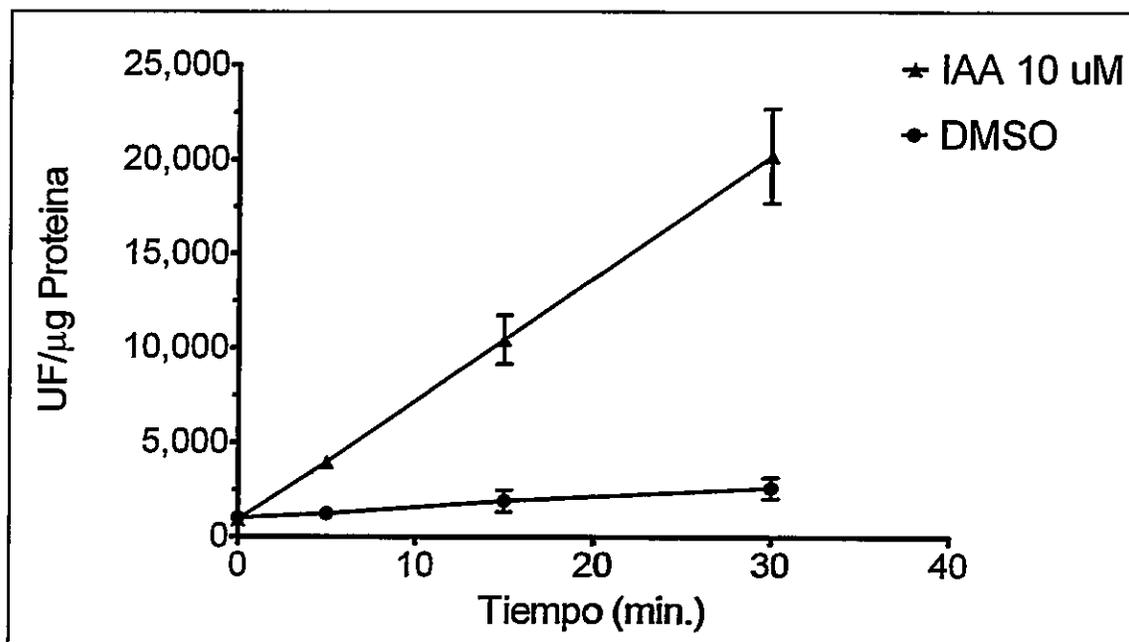


Figura 6. La cinética de la hidrólisis de MU a MUG, catalizada por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, es lineal al menos hasta los 30 minutos de reacción. El ensayo se realizó con extracto de proteínas totales de plantas de 7 días que fueron sometidas a los distintos tratamientos por 24 horas. Los tratamientos son MC con DMSO 1%, MC con Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MC con IAA 10  $\mu\text{M}$  y por último MC con IAA 10  $\mu\text{M}$  junto con Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La reacción se detuvo al tiempo de reacción 0, 5, 15 y 30 min. con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M. La fluorescencia se midió usando el filtro de emisión 360/40 nm y el filtro de excitación 440/30 nm a 25 °C.

En la figura 7 se muestran los resultados del ensayo fluorométrico deteniendo la reacción a los 15 minutos con alícuotas de extracto de proteínas proveniente de plantas que reciben los distintos tratamientos.

El mismo comportamiento que se documentó en el ensayo histoquímico es observado cuantitativamente con este ensayo fluorométrico. Para facilitar el análisis, los nombres de los tratamientos en este ensayo se corresponden con los usados en el ensayo histoquímico. La incubación con IAA 10  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo es capaz de activar al gen GUS, lo que se observó como un aumento de la fluorescencia (A3) con respecto a lo registrado en las condiciones controles que corresponde a MC con DMSO

1% (A1). Este experimento confirmó que Sortin2 no tiene la propiedad de actuar como auxina (A2). Interesantemente, cuando se sometió a las plantas a MC con IAA 10  $\mu$ M junto con Sortin2 50  $\mu$ g/mL, la activación del sistema reportero disminuye a valores que son estadísticamente similares a los observados en condiciones sin auxina exógena (A1 y A2). Lo anterior indicaría que Sortin2 inhibe completamente la activación del sistema reportero DR5::GUS causado por IAA.

En el inserto de la figura 7 se grafican los resultados relativizando al grado de activación del sistema reportero DR5:GUS, obtenidos al tratar las plántulas en MC con IAA 10  $\mu$ M, asumiendo el valor 1. La inducción del sistema reportero cae aproximadamente 5 veces cuando el MC contiene la hormona IAA junto con el químico Sortin2 (IAA+S2). La condición control (DMSO) presenta el mismo nivel de inducción que la observada en plántulas tratadas con hormona y químico, indicando que el químico lleva la inducción del sistema DR5:GUS a niveles basales.

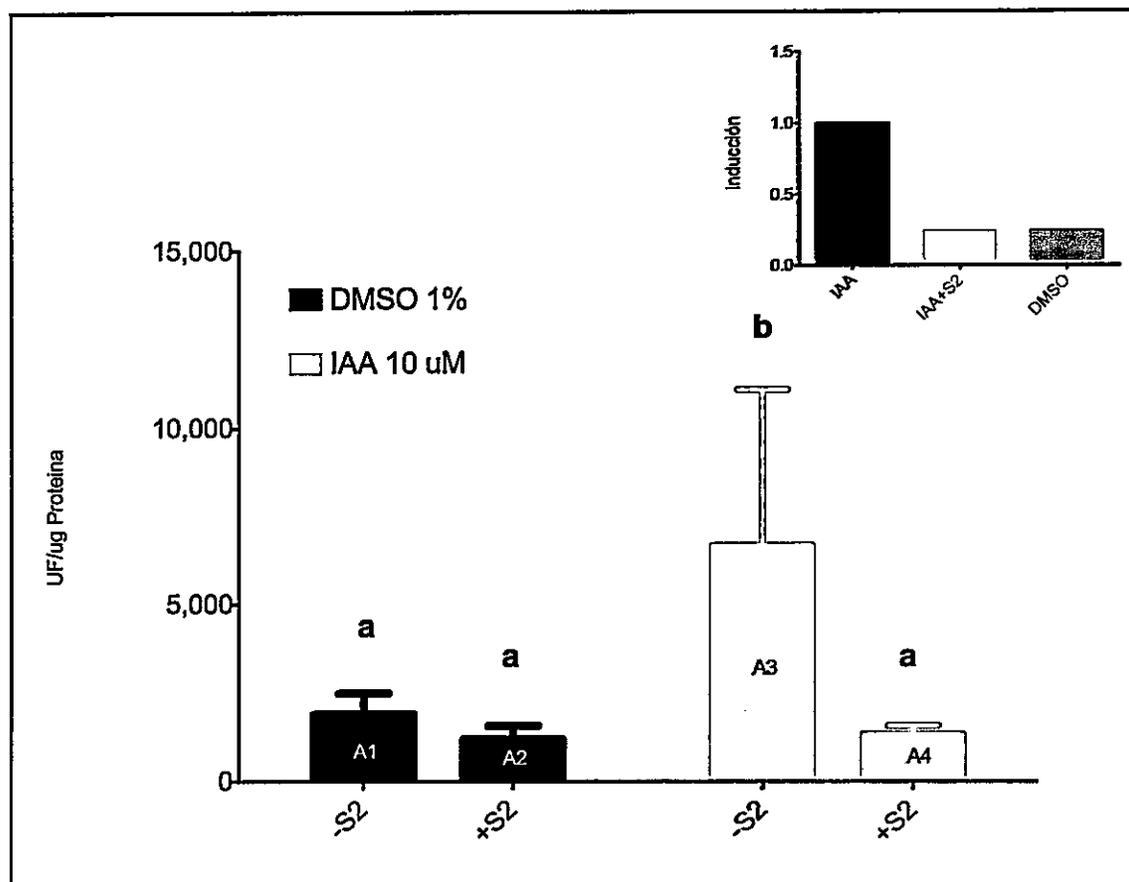


Figura 7. Sortin2 inhibe completamente la respuesta a IAA, medido mediante ensayo cuantitativo. El ensayo se realizó con extracto de proteínas totales de plantas de 7 días que fueron sometidas a los distintos tratamientos (A1-A4) por 24 horas. La fluorescencia obtenida se midió a los 15 minutos de iniciada la reacción. La fluorescencia se midió usando el filtro de emisión 360/40 nm y el filtro de excitación 440/30 nm a 25 °C. El gráfico se construyó usando los resultados de dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno. A1, plántulas tratadas con DMSO 1% v/v. A2, plántulas tratadas con Sortin2 50 µg/mL. A3, tratamientos con IAA 10 µM. A4, tratamientos con IAA 10 µM junto con Sortin2 50 µg/mL. Los datos fueron sometidos al análisis estadístico ANOVA de dos vías, usando el programa computacional GraphPad Prism®. Con esto se resolvió que los valores asignados con una letra a minúscula no son significativamente diferentes con un  $P < 0.05$  y usando un  $n=4$ . El valor asignado con la letra b sí es significativamente distinto de todos los valores a. El inserto compara la activación del gen GUS relativa a la obtenida en tratamientos con IAA 10 µM. Tratamientos con IAA 10 µM junto con Sortin2 50 µg/mL logra reducir la activación a los mismos niveles que los obtenidos en condiciones control (MC con DMSO 1% v/v).

### 3.4 Sortin2 altera la respuesta de IAA, NAA y 2,4-D

Para evaluar si la inhibición causada por Sortin2 es específica para la señalización de IAA o bien es, en general, para moléculas con actividad auxina, se evaluó el efecto de Sortin2 en la activación del sistema reportero DR5::GUS provocado por dos auxinas sintéticas. Las auxinas usadas fueron ácido 1-naftaleno acético (NAA) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Si Sortin2 es selectivo para inhibir sólo la respuesta de IAA, sería sugerente de que el químico podría estar formando algún complejo o modificando a IAA, disminuyendo su concentración efectiva en la plántula. En cambio, si la inhibición de Sortin2 es general para otras auxinas sugiere que Sortin2 estaría afectando mecanismos de señalización en común entre las hormonas.

En plántulas tratadas con MC que contiene NAA 1  $\mu$ M (A5) ó 2,4-D 1  $\mu$ M (A7) se produjo una activación génica similar a la obtenida con IAA 10  $\mu$ M (A4 en figura 7 y 5). El análisis estadístico muestra que la activación producida, a las concentraciones usadas, por las tres hormonas auxinas, son significativamente iguales (letra b sobre la barra en la figura 8).

De manera muy interesante, cuando las plántulas son tratadas con MC con cualquiera de estas auxinas junto con Sortin2 50  $\mu$ g/ml, la activación del sistema DR5::GUS que se cuantificó cayó hasta los niveles observados en las condiciones donde no se agregó hormona exógenamente (A1 y A2) (letra a sobre la barra).

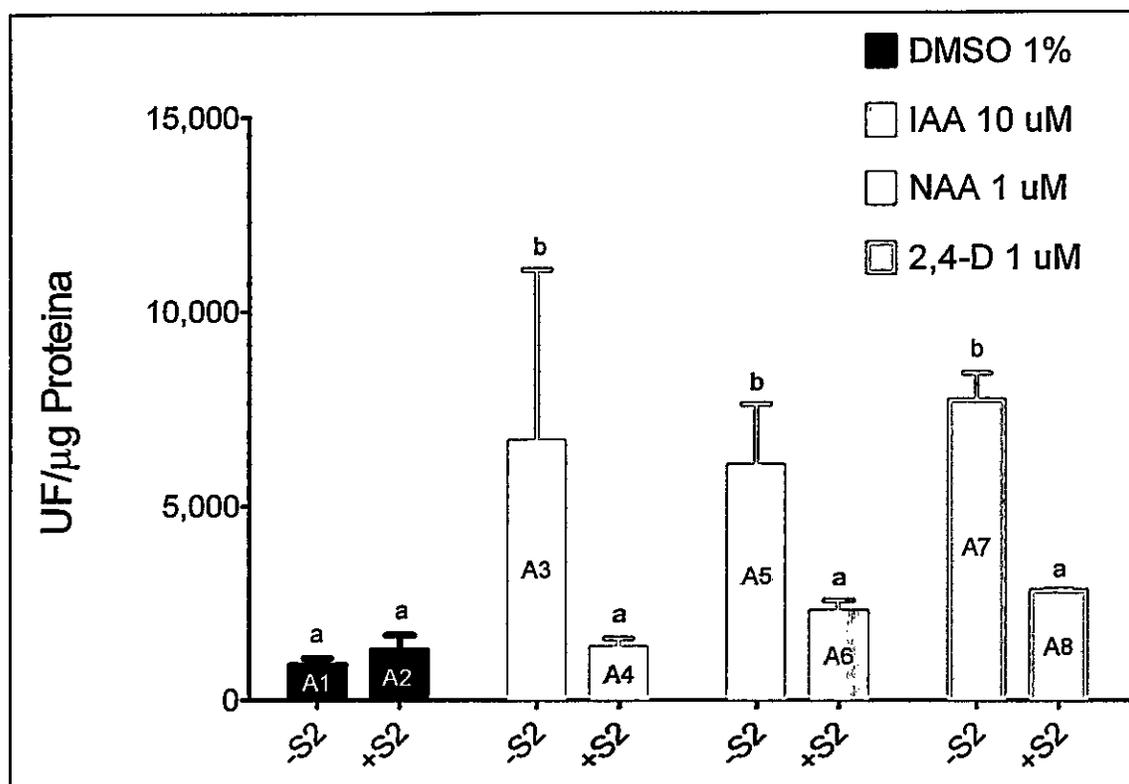


Figura 8. Sortin2 inhibe la respuesta a las auxinas IAA, NAA y 2,4-D. Se siguió el mismo procedimiento descrito en la figura 7. Las concentraciones finales usadas de Sortin2 para todos los tratamientos fue de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Se usó concentración final de IAA de 10  $\mu\text{M}$ , NAA de 1  $\mu\text{M}$  y 2,4-D 1  $\mu\text{M}$ . A1, plántulas tratadas en MC con DMSO 1% v/v. A2, plántulas tratadas en MC con Sortin2. A3, tratamientos en MC con IAA. A4, plántulas tratadas en MC con IAA junto con Sortin2. A5, plántulas tratadas en MC con NAA. A6, plántulas tratadas en MC con NAA junto con Sortin2. A7, plántulas tratadas en MC con 2,4-D. A8, plántulas tratadas en MC con 2,4-D junto con Sortin2. El gráfico se construyó usando los resultados de dos experimentos independientes con dos replicas cada uno. Los datos fueron sometidos al análisis estadístico ANOVA de dos vías, usando el programa computacional GraphPad Prism®. Con esto se resolvió que los valores asignados con una letra a minúscula no son significativamente diferentes con un  $P < 0.05$  y usando un  $n=4$ . El valor asignado con la letra b si es significativamente distinto de todos los valores a.

### 3.5 Localización de los facilitadores de auxina PIN1 y PIN2 fusionado a la proteína reportera GFP en condiciones controles.

El primer paso en la señalización de las auxinas es su transporte hasta el lugar donde ejerzan su efecto. Las auxinas viajan a través de la planta mediante un mecanismo de transporte polarizado, que requiere la intervención de proteínas facilitadoras de influjo/eflujo de auxina. Las proteínas facilitadoras de eflujo son principalmente los miembros de la familia PIN, dentro de las cuales PIN1 y PIN2 son las más estudiadas.

Para analizar si la inhibición que Sortin2 presenta sobre la respuesta a auxina se debe a una deslocalización de las proteínas facilitadoras, se requiere en primer lugar analizar la localización de estas proteínas en nuestras condiciones de estudio controles. Para ello, se usaron las líneas transgénicas de *A. thaliana* PIN2:GFP y PIN1:GFP, que corresponden a la mutante funcional *pin* complementada con la versión silvestre del gen, fusionada a la proteína reportera GFP y controlado por el respectivo promotor endógeno.

Ambas líneas transgénicas o marcadoras, son usadas en las próximas secciones para observar la localización subcelular de los facilitadores de auxina cuando plántulas son tratadas con Sortin2.

En la introducción se mencionó que estos facilitadores pueden ubicarse principalmente en ciertas caras de la membrana plasmática, generando el fenómeno llamado localización polar de los facilitadores de auxina. Para verificar la localización descrita en la literatura de los facilitadores PIN1 y PIN2 bajo nuestras condiciones de estudio, se observaron al microscopio confocal plántulas de 7 días de crecimiento en

condiciones controles. Con esto se pretende determinar en qué grupo celular o plano focal es más fácil denotar la localización polar.

En la figura 9A se muestra la localización de los facilitadores de auxina PIN2 mediante una colección de imágenes tomadas por microscopía confocal de la punta de la raíz. La colección de imágenes corresponde a una serie de imágenes adquiridas en distintos planos focales de la raíz. Cada plano focal está separado por una distancia de 1,2  $\mu\text{m}$  del anterior. En todos los planos focales se observa la localización de PIN2 en la membrana plasmática. A medida que avanzamos en los planos focales, (mayor profundidad en el eje Z), notamos un cambio en cómo se dispone la fluorescencia de la proteína reportera de PIN2 (figura 9A). Para analizar mejor esta situación se utilizó un código de colores, según una escala arbitraria, para definir a cada plano focal y luego se superpusieron todos en una sola imagen (figura 9B). Al observar la figura 9B, notamos que ciertos colores se denotan en el centro de la imagen (morados) y otros en los bordes (blanco). Para percibir lo que esto implica, se generó una reconstrucción tridimensional con la colección coloreada y luego, se obtuvo un corte transversal del modelo (inserto de la figura 9B). La conformación cóncava del corte transversal nos confirma la localización, de la proteína PIN2, en las capas celulares periféricas de la raíz, epidermis y corteza, y concuerda con lo observado en la superposición de las imágenes de la colección. En la imagen de la figura 9B es posible distinguir la presencia de cuerpos intracelulares que corresponderían a cuerpos endosomales según lo que ha sido descrito en la bibliografía (Geldner y col., 2001). Es posible observar también la localización polar de PIN2, en la membrana, cuando prestamos atención a los planos focales tomados a mayor profundidad en el eje Z y que están coloreados en blanco.

En la figura 9C se presenta la colección de imágenes obtenidas con plántulas de la línea transgénica PIN1:GFP. Las imágenes muestran una porción central de la punta de la raíz. El facilitador de auxina PIN1 se localiza en la cara basal (hacia el ápice de la raíz). Las imágenes obtenidas presentan notorias diferencias a medida que se varía el plano focal. Los primeros planos (1-3) permiten observar en detalle la localización polar de la proteína PIN1 en la membrana plasmática. Al igual que PIN2, en las células jóvenes de la corteza, PIN1 se localiza primordialmente en la cara inferior (basal) de la membrana plasmática. En otros planos focales como el 8, también podemos notar esta polarización en las líneas celulares de los bordes de la imagen.

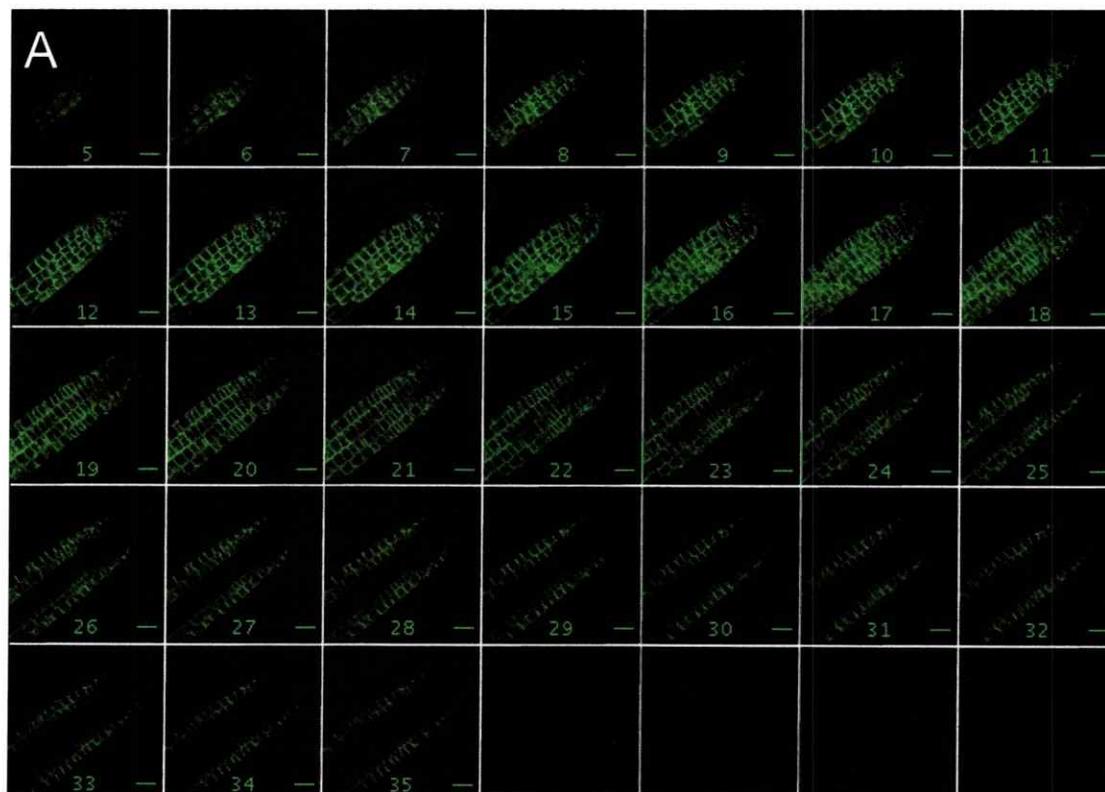


Figura 9. La localización polar de los facilitadores de auxina es más notoria en algunos planos focales. Plántulas de las líneas transgénicas PIN2:GFP y PIN1:GFP fueron crecidas por 7 días en MC y luego montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y capturando la fluorescencia en el rango de 505-550 nm. **A, Colección de imágenes de la punta de la raíz de plántulas de la línea PIN2:GFP.** La colección abarca desde el primer plano focal donde se observa fluorescencia hasta el último plano en donde el láser ya no puede seguir excitando la proteína GFP. La distancia entre cada plano focal es de 1,2  $\mu\text{m}$ . La barra de tamaño representa 30  $\mu\text{m}$ .

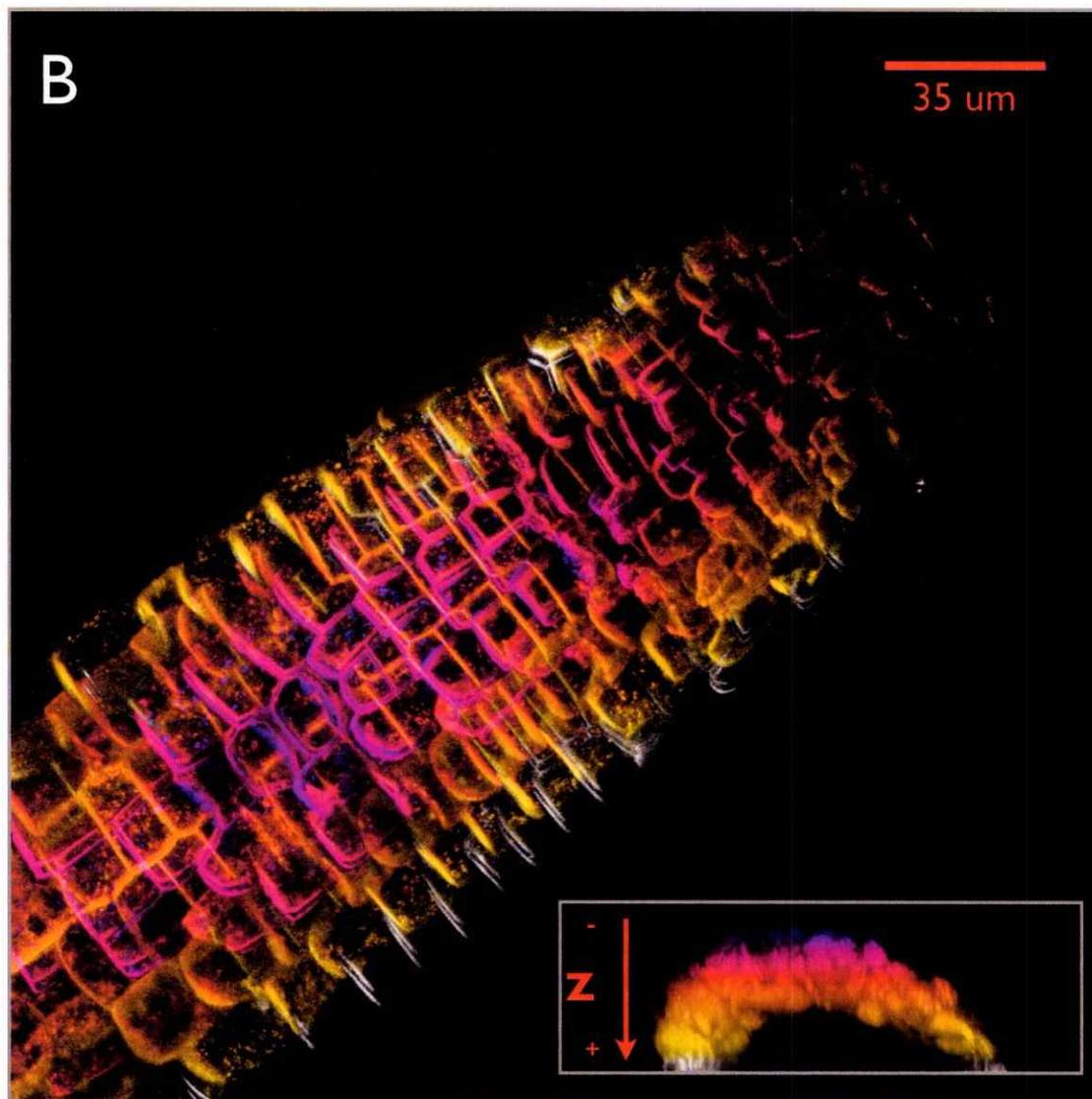


Figura 9. La localización polar de los facilitadores de auxina es más notoria en algunos planos focales. Plántulas de las líneas transgénicas PIN2:GFP y PIN1:GFP fueron crecidas por 7 días en MC y luego montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y capturando la fluorescencia en el rango de 505-550 nm. **B**, Suma de los imágenes en A en un sólo plano focal. Cada plano focal es coloreado según una escala arbitraria y luego sumadas en un solo plano focal. En el inserto se observa un corte transversal de la reconstrucción tridimensional que se obtuvo con la colección de imágenes en A.

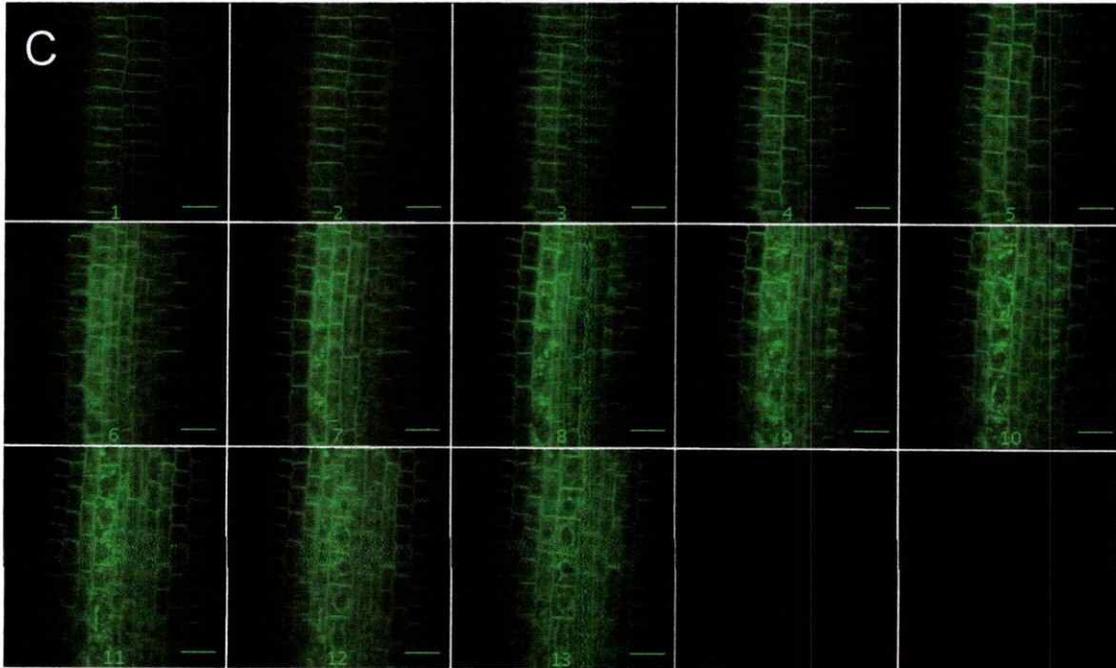


Figura 9. La localización polar de los facilitadores de auxina es más notoria en algunos planos focales. Plántulas de las líneas transgénicas PIN2:GFP y PIN1:GFP fueron crecidas por 7 días en MC y luego montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y capturando la fluorescencia en el rango de 505-550 nm. **C**, Colección de imágenes de una sección de la punta de la raíz de PIN1:GFP. La colección muestra un acercamiento a la porción central de la punta de la raíz. La distancia entre cada plano focal es de 1,04  $\mu\text{m}$ . La barra de tamaño representa en ambas colecciones a 15  $\mu\text{m}$ .

### **3.6 Sortin2 altera la localización subcelular de PIN2 en plantas germinadas en tratamientos con el químico.**

Considerando que Sortin2 altera el crecimiento de la raíz y que además inhibe la señalización causada por auxinas, es importante analizar el efecto de Sortin2 sobre la localización subcelular de los facilitadores que median el transporte de éstas. Plántulas que fueron germinadas en las mismas condiciones que las expuestas en la figura 4, se observaron al microscopio confocal. Se observaron sólo aquellas condiciones en donde aún es posible obtener una raíz bien definida (ver figura 4).

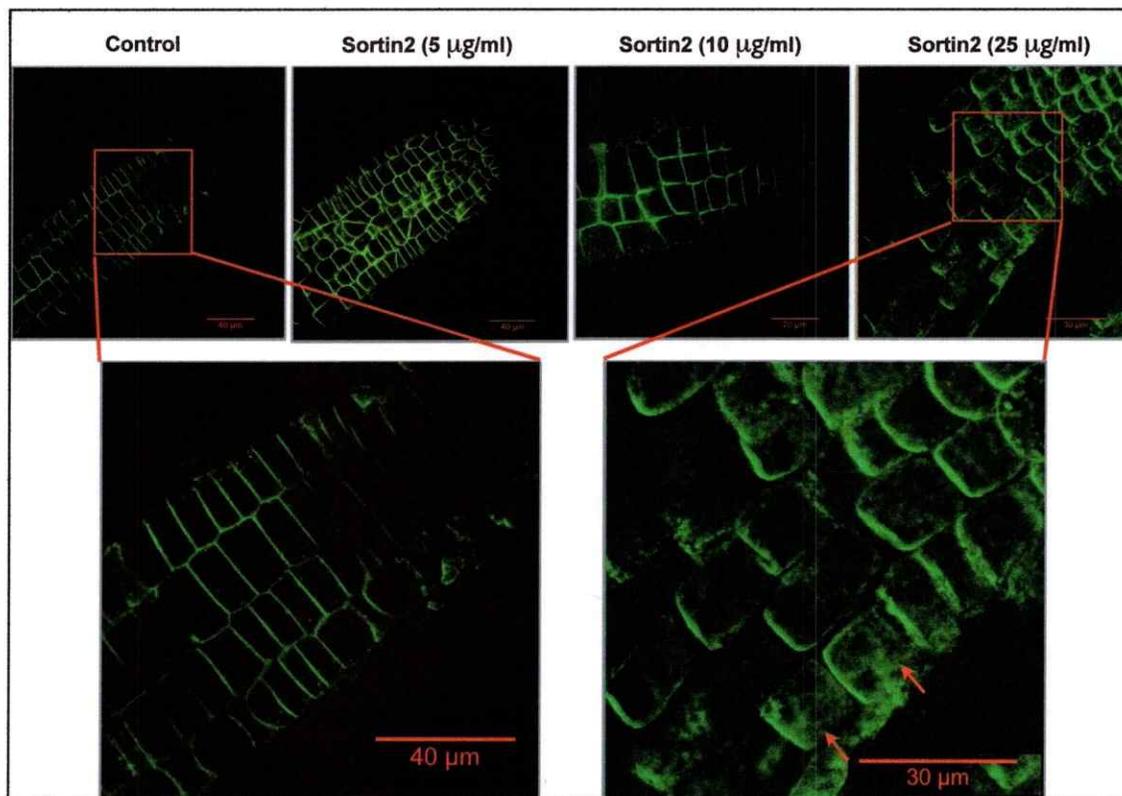


Figura 10. **Sortin2 altera la localización subcelular de PIN2 y la orientación en la división celular.** Plántulas de 7 días de la línea PIN2:GFP, germinadas en tratamientos con Sortin2 a distintas concentraciones, fueron observadas mediante microscopía confocal. Las plántulas fueron montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y captando la fluorescencia en el rango entre 505-550 nm. Las concentraciones finales de Sortin2 en el medio de cultivo son indicadas en la parte superior y un acercamiento para la condición control y la condición Sortin2 25 µg/mL, es mostrado para evidenciar la pérdida de la localización de PIN2. Los resultados corresponden a imágenes representativas de 2 experimentos. Las barras de tamaño están indicadas.

La localización de PIN2 observada en plántulas crecidas en 5  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$  es principalmente en la membrana plasmática (figura 10). En las plántulas sometidas a 5  $\mu\text{g/mL}$ , se hace evidente la pérdida de los planos de división de las células de la punta de la raíz. De manera muy interesante, cuando las plántulas son germinadas en 25  $\mu\text{g/mL}$  se observa PIN2 localizado en ambos compartimentos: la membrana plasmática y el citoplasma (flechas rojas en el zoom de la figura 10). Sin embargo, la fluorescencia a nivel citoplasmático se observa como un patrón difuso a diferencia de la condición control en el que PIN2 está localizado en cuerpos intracelulares que corresponderían a endosomas (zoom de la figura 10).

### **3.7 Sortin2 altera la localización polar de PIN2 en plantas de 7 días tratadas con Sortin2**

Con el objetivo de descartar que la deslocalización de PIN2 en tratamientos con Sortin2, mostrada en la sección anterior, se explique por diferencias en el estadio de desarrollo de la raíz, se analizó el efecto de Sortin2 sobre PIN2:GFP en plántulas adultas que luego son tratadas con el químico. Este tratamiento es equivalente al que se usó para observar la inhibición causada por Sortin2 de la respuesta a auxina, es decir, tratamientos de 24 horas con Sortin2 a plántulas de 7 días crecidas en condiciones normales.

Cuando las plántulas son tratadas en MC con Sortin2 25  $\mu\text{g/mL}$  se observa que la localización polar de los facilitadores se altera, como se aprecia en la imagen de la figura 11. Comparar los insertos de esta figura ayudan a percatarse de la diferencia en la localización de la proteína PIN2. Mientras en la condición encontramos PIN2 predominantemente en la cara apical, en el tratamiento observamos que la proteína PIN2 se localiza apolarmente en todas las caras de la membrana plasmática,

sugiriendo fuertemente que el mecanismo que permite la localización polar de los facilitadores está siendo alterado por el químico.

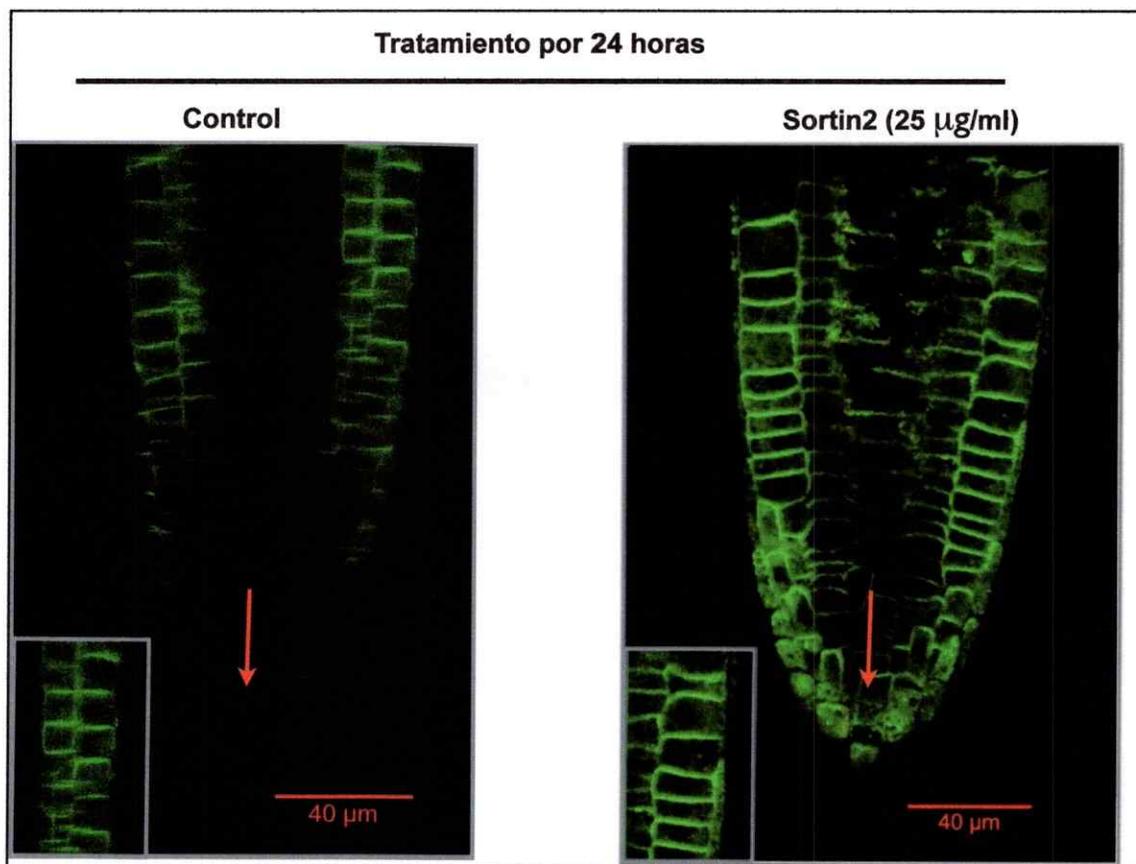
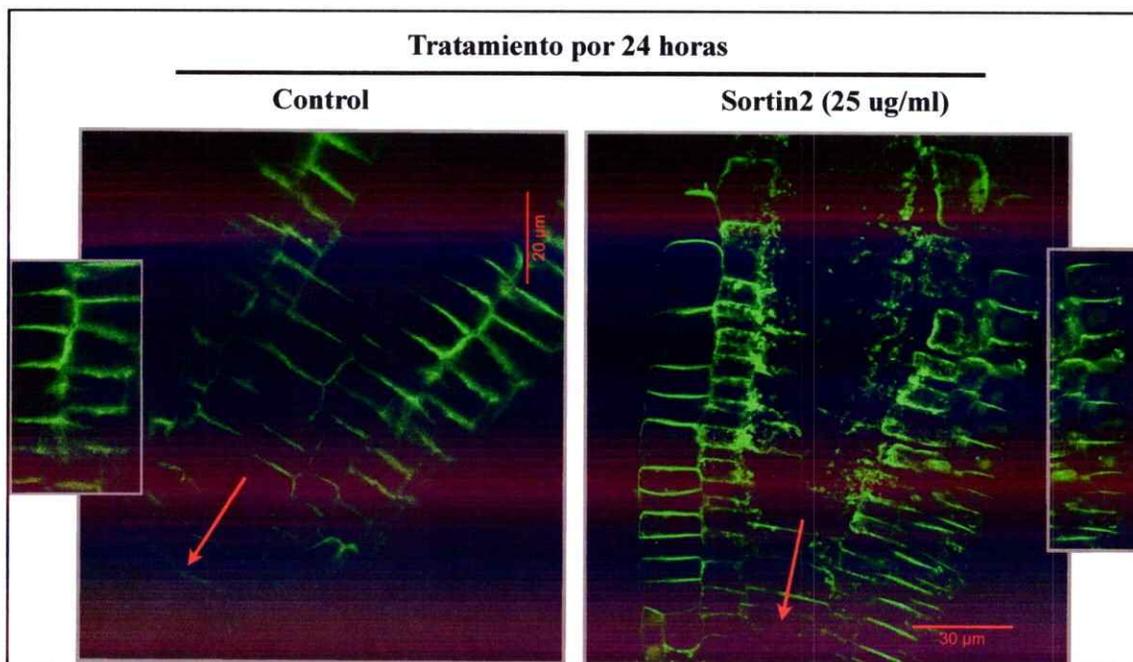


Figura 11. **Sortin2 altera la localización polarizada de PIN2 en la membrana plasmática.** Plántulas de 7 días de la línea PIN2:GFP, germinadas en MC fueron dispuestas durante 24 horas a tratamientos con Sortin2 25 µg/mL y luego observadas con microscopía confocal. Las plántulas fueron montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y captando la fluorescencia en el rango entre 505-550 nm. El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad. El inserto en la parte inferior izquierda es un extracto de la imagen grande que evidencia la alteración de la localización polar de los facilitadores de auxina PIN2. Las barras de tamaño están indicadas. Las flechas rojas se orientan hacia la punta de la raíz.

### **3.8 Sortin2 localiza a PIN2 en compartimentos intracelulares en plantas de 7 días tratadas con Sortin2**

De manera muy interesante, bajo las mismas condiciones de la sección anterior, otro interesante fenotipo se observó al analizar las imágenes de las plántulas que recibieron tratamiento. Como se observa en la figura 12, PIN2, bajo la acción de Sortin2, se localiza en compartimentos intracelulares de tamaño mayor a los compartimentos endosomales. Los insertos de la figura 12 permiten apreciar la notable diferencia que existe entre la condición control y el tratamiento. De manera muy interesante, los dos fenómenos de alteración de polaridad y acumulación intracelular, no se observan simultáneamente en las mismas células.



**Figura 12. Sortin2 localiza al facilitador de auxina PIN2 en compartimentos intracelulares de gran tamaño.** Plántulas de 7 días de la línea PIN2:GFP, germinadas en MC fueron dispuestas durante 24 horas a tratamientos con Sortin2 25 µg/mL y luego observadas con microscopía confocal. Las plántulas fueron montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y captando la fluorescencia en el rango entre 505-550 nm. El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad. El inserto a los costados es un extracto de la imagen que evidencia la presencia de esta acumulación de PIN2 en cuerpos intracelulares de tamaño mayor que los endosomas. Las barras de tamaño están indicadas en la imagen. Las flechas rojas se orientan hacia la punta de la raíz.

### **3.9 Tratamientos con oscuridad, al igual que Sortin2, localizan a PIN2 en compartimentos intracelulares**

Recientemente ha sido demostrado que la luz juega un papel fundamental en la regulación de la distribución intracelular del facilitador de eflujo PIN2 (Laxmi y col., 2008). Cuando plantas crecidas en luz son sometidas a tratamientos de oscuridad se detecta localización de PIN2 en compartimentos vacuolares. Para analizar si los compartimentos subcelulares observados con tratamientos de Sortin2, son similares a los que se originan por tratamientos con oscuridad, observamos con microscopía confocal a plántulas de 7 días que son expuestas a 4 y 24 horas de tratamiento con oscuridad.

En la figura 13 se muestran las imágenes de 3 plantas distintas incubadas en oscuridad durante 4 horas y comparadas con la condición control en la que se mantienen en luz. PIN2 en el tratamiento de oscuridad es inducido a localizarse en compartimentos intracelulares de tamaño mayor que los endosomas. En la imagen central de las controles (luz) se observa un plano focal donde los endosomas son fácilmente identificables (flechas rojas). Los cuerpos identificados con flechas amarillas en los tratamientos con oscuridad son notoriamente más grandes que los endosomas (flechas rojas). Estos cuerpos de gran tamaño se localizan, al igual que los cuerpos ocasionados por efecto de Sortin2, en las cercanías de la membrana plasmática.



### **3.10 Sortin2 induce localización de PIN2 en compartimentos intracelulares de bajo tamaño en plantas de 7 días tratadas con Sortin2**

Cuando las plántulas de 7 días son tratadas con Sortin2 por periodos entre 6-48 horas, se observa que la localización de PIN2 no solo se ve alterada provocando pérdida de polaridad y cuerpos intracelulares similares a los observados en tratamientos con oscuridad, sino que también, un aumento en la cantidad y el tamaño de cuerpos intracelulares similares a endosomas. La figura 14A muestra la localización de PIN2 en condiciones controles. En la figura 14B se demuestra nuevamente la dosis dependencia del efecto de Sortin2 toda vez que el fenotipo no aparece sino hasta en los tratamientos por 48 horas. PIN2 a las 6 horas de tratamiento con Sortin2, no presenta localización alterada. Por otro lado, a las 24 horas se nota la presencia de muchos cuerpos endosomales propios de la localización de PIN2. Sólo cuando ascendemos a 48 horas de tratamiento PIN2 se localiza rodeando al núcleo, porque no se superponen al vacío central que se observa en varias de las células de la imagen de las plántulas tratadas durante 48 horas.

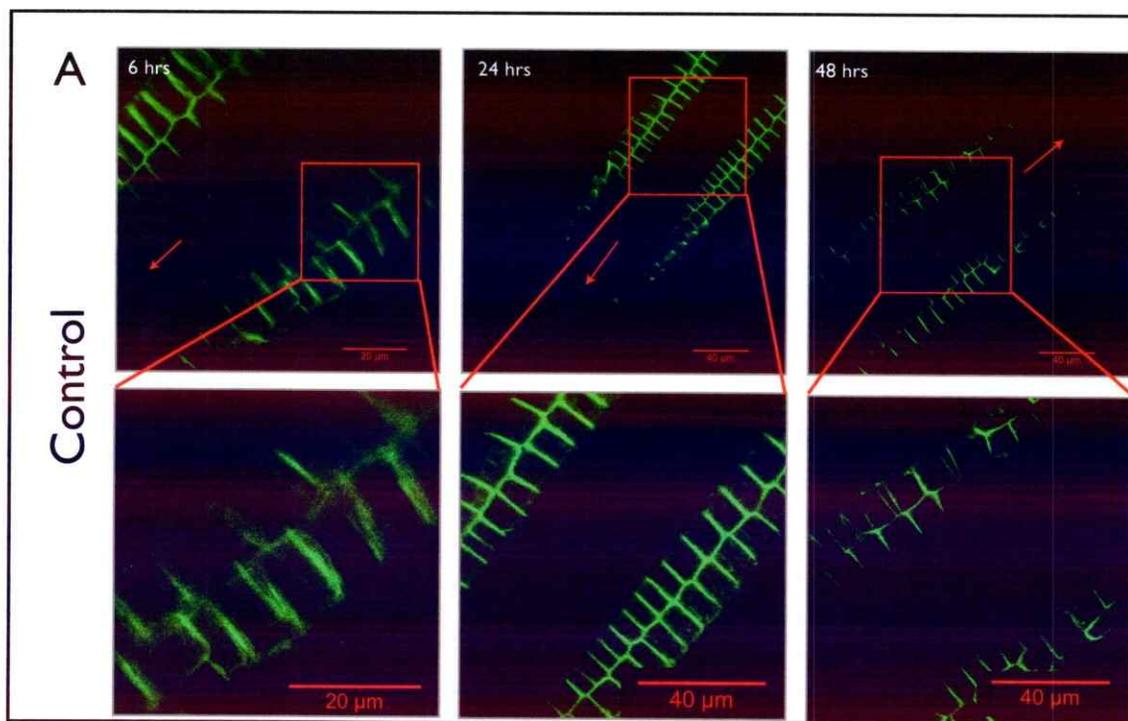


Figura 14. **Sortin2** localiza al facilitador de auxina **PIN2** en compartimentos intracelulares de tamaño similar al de endosomas. Plántulas de 7 días de la línea PIN2:GFP fueron germinadas en MC y luego sometidas a tratamientos con Sortin2 por distintos periodos de tiempo. Se presentan imágenes de 3 plantas distintas sometidas a 6, 24, 48 horas en tratamientos con Sortin2. **A, Condición control tratadas en MC con DMSO 1%.** Las plántulas fueron montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y captando la fluorescencia en el rango entre 505-550 nm. Las flechas rojas se orientan hacia la punta de la raíz.

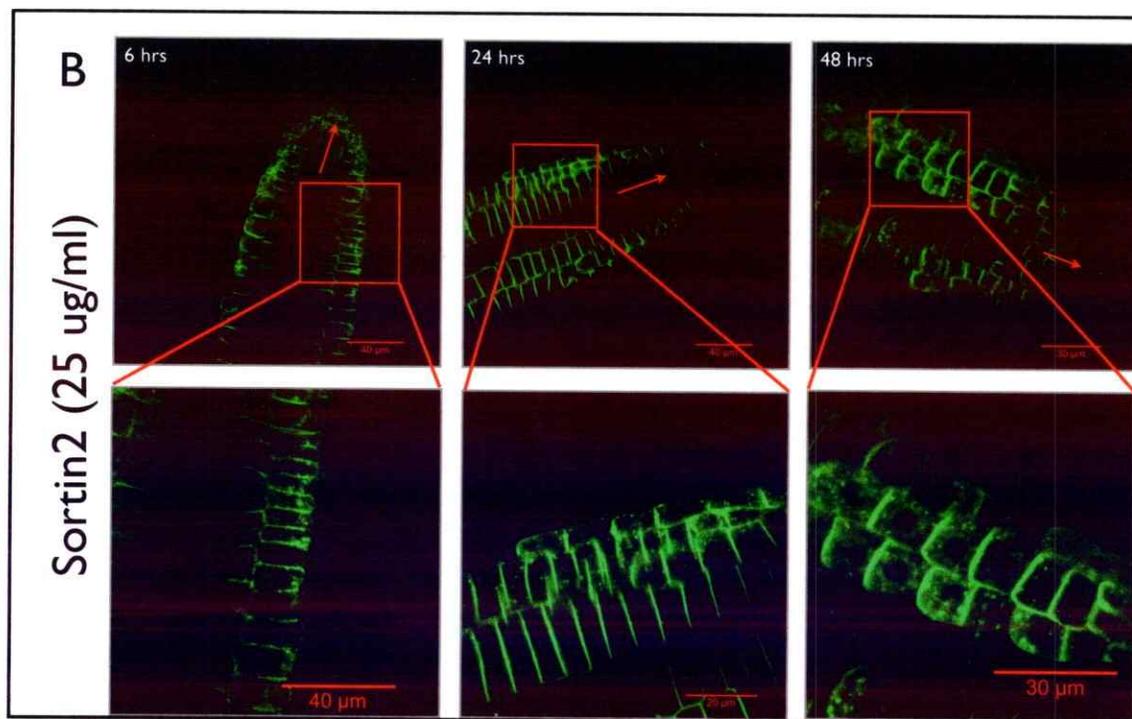


Figura 14. Sortin2 localiza al facilitador de auxina PIN2 en compartimentos intracelulares de tamaño similar al de endosomas. Plántulas de 7 días de la línea PIN2:GFP fueron germinadas en MC y luego sometidas a tratamientos con Sortin2 por distintos periodos de tiempo. Se presentan imágenes de 3 plantas distintas sometidas a 6, 24, 48 horas en tratamientos con Sortin2. **B, Tratamientos con Sortin2 25 ug/ml.** Las observaciones fueron hechas igual que en A. El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad. Las flechas rojas se orientan hacia la punta de la raíz.

### **3.11 Sortin2 induce la deslocalización de PIN1 en plantas germinadas en los tratamientos con el químico.**

Para analizar que la alteración que Sortin2 provoca sobre la localización del facilitador de auxina PIN2, puede ser un efecto general sobre otros miembros de la familia PIN, se observó el efecto de Sortin2 en la localización de PIN1:GFP. Para ello plántulas de la línea transgénica PIN1:GFP fueron germinadas en tratamientos con Sortin2 a distintas concentraciones.

La localización de PIN1, como se observa en la figura 15A, se ve muy alterada cuando las plántulas son germinadas en presencia de Sortin2. PIN1 en gran parte de las células no se encuentra en la membrana plasmática, sino que acumulado en cuerpos intracelulares que rodean a la porción central de las células, donde estaría ubicado el núcleo de la célula. Sin embargo, en algunas células, PIN1 permanece en la membrana plasmática.

La localización de PIN1 también es alterada por efecto de tratamientos con Sortin2 cuando se tratan con el químico a plántulas de 7 días germinadas en MC. En la figura 15B se presentan las imágenes que demuestran la alteración de la localización de PIN1. Tanto en los tratamientos con Sortin2 25 ug/mL como en 50 ug/mL observamos la presencia de cuerpos intracelulares que no están presentes en el control. Se muestran imágenes adquiridas en un plano focal equivalente para hacer evidente que los cuerpos que se presentan son efecto de los tratamientos con Sortin2.

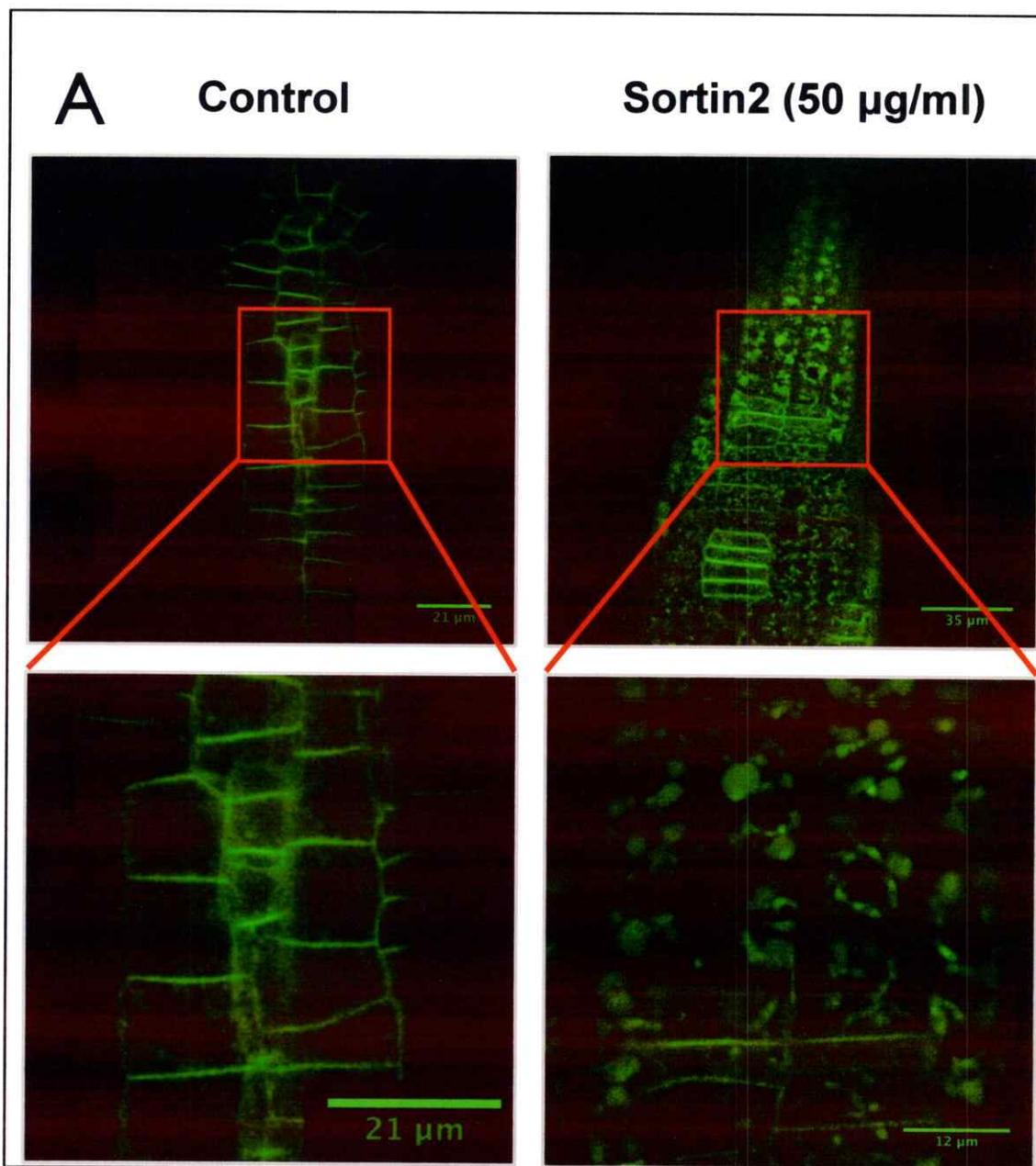


Figura 15. **Sortin2 altera la localización de PIN1.** Plántulas, germinadas o tratadas en Sortin2, de la línea PIN1:GFP fueron montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y captando la fluorescencia en el rango entre 505-550 nm. **A, Plántulas germinadas en los tratamientos con Sortin2.** Se observaron plántulas germinadas en MC con Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Acercamientos de cada imagen son mostradas para observar de mejor manera las diferencias en la localización.

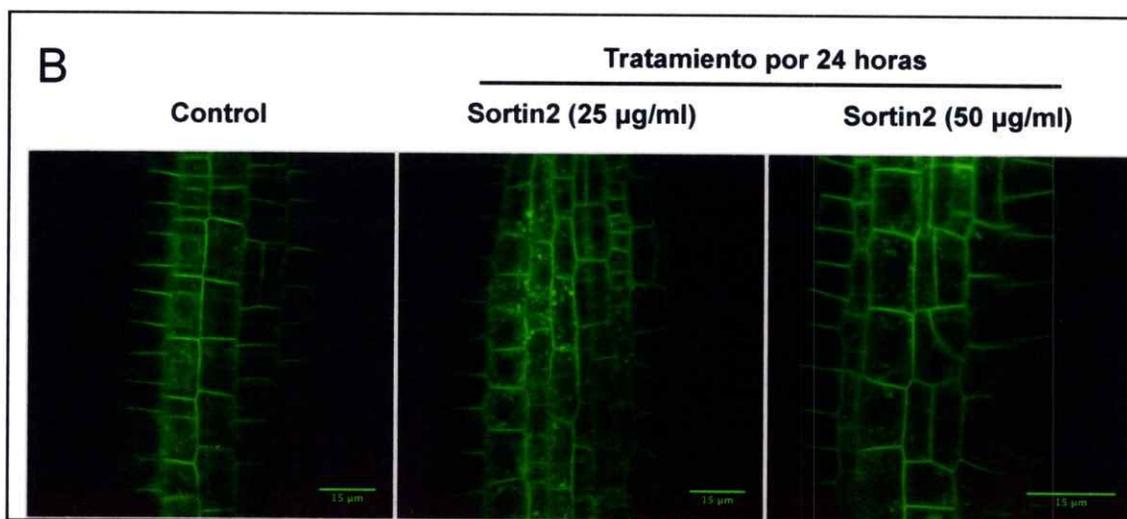


Figura 15. **Sortin2 altera la localización de PIN1.** Plántulas, germinadas o tratadas en Sortin2, de la línea PIN1:GFP fueron montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y captando la fluorescencia en el rango entre 505-550 nm. **B, Plántulas de 7 días tratadas con Sortin2.** Plántulas germinadas en MC fueron dispuestas durante 24 horas en tratamientos con Sortin2 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ . El experimento se repitió 3 veces analizando al menos 3 plántulas en cada oportunidad. Las barras de tamaño están indicadas.

### **3.12 Sortin2 altera la localización de la proteína receptora de brasinosteroides BRI1**

Para analizar si el efecto de Sortin2 es específico sobre proteínas que están involucradas con el transporte de auxina, se analizó la localización de otra proteína de membrana plasmática, el receptor de brasinosteroides BRI1. Este receptor se localiza en la membrana y presenta también, al igual que PIN1 y PIN2, reciclaje endocítico, usando como intermediario al sistema endosomal.

Se analizaron plántulas de la línea transgénica BRI1:GFP germinadas en tratamientos con Sortin2 usando microscopía confocal. La figura 16 muestra imágenes de la punta de la raíz de plántulas germinadas en tratamientos de Sortin2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en donde podemos observar que la localización del receptor de brasinosteroides es en la membrana plasmática, pero también en cuerpos intracelulares de gran tamaño que están resaltados en la imagen con flechas rojas. En las imágenes de la condición control no se identifican cuerpos del tamaño de aquellos observados en el tratamiento. Sí encontramos en la condición control la presencia, como es de esperar, de cuerpos endosomales. Sortin2, entonces, altera la localización no sólo de facilitadores de auxina, sino que también de proteínas de membrana que poseen, al igual que PINs, un mecanismo de reciclaje endocítico.

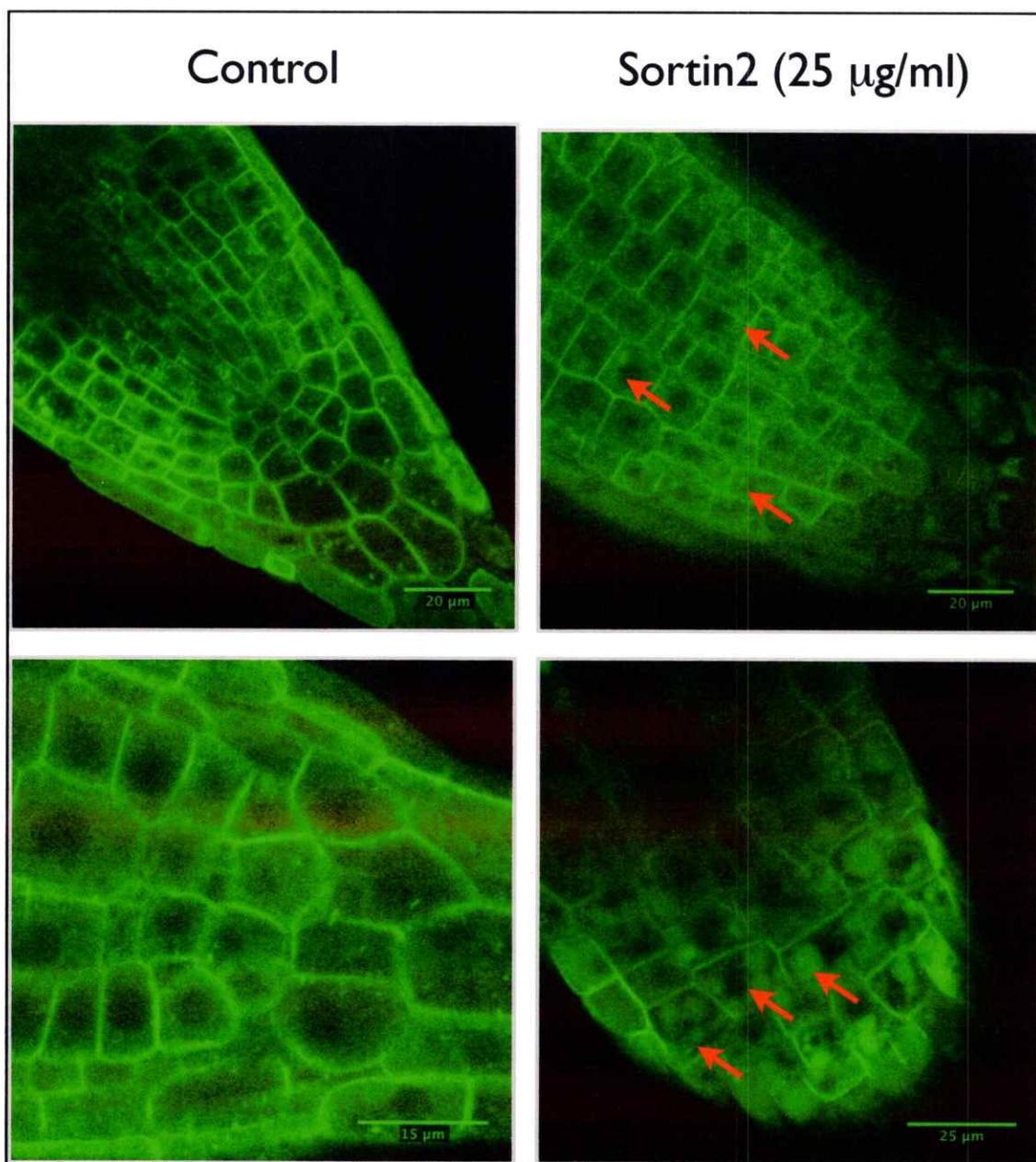


Figura 16. **Sortin2 altera la localización de la proteína receptora de brasinosteroides BRI1.** Plántulas de la línea transgénica BRI1:GFP fueron crecidas por 7 días en MC con Sortin2 25 ug/ml y luego montadas en MC líquido en un portaobjeto y observadas al microscopio confocal excitando con 488 nm y capturando la fluorescencia en el rango de 505-550 nm.

## DISCUSIÓN

### 4.1 Sortin2 genera particulares fenotipos en *A. thaliana*

La severidad de la alteración que provoca Sortin2 en las plántulas crecidas en presencia del compuesto no es homogénea a través de la planta. Sortin2 altera notablemente el crecimiento de la raíz, pero no posee, en cambio, un drástico efecto en la constitución de los cotiledones. Esto podría estar indicando que los mecanismos celulares que se ven afectados por Sortin2 tienen mayor incidencia en el desarrollo de la región subsuelo que en las partes aéreas de la planta. Uno de los fenómenos fisiológicos de importancia para las plantas, que comunica a estas dos regiones de la planta, es el transporte de las auxinas desde la zona principal de síntesis, en la parte aérea, hasta la punta de la raíz. Las auxinas son las únicas hormonas del crecimiento de plantas que se movilizan polarmente de célula a célula con la mediación de proteínas facilitadoras (Taiz y Zeiger, 2006). Cuando las plantas son sometidas a inhibidores del transporte polar (PAT) como la droga brefeldina A (BFA) se observan fenotipos similares a los observados bajo tratamientos con Sortin2 en cuanto a la morfología de la planta y la pérdida de su respuesta gravitrópica.

Sortin2 no sólo tiene un efecto en plantas germinadas en tratamientos con este químico sino que también tiene un efecto al tratar plántulas, indicando que su efecto es inducible. Tanto la interferencia de la respuesta a auxina como la deslocalización de PIN1 y PIN2, que causa Sortin2 fue analizado en plántulas desarrolladas en condiciones controles y luego tratadas con Sortin2. Además datos que no se mostraron en este seminario de título indican que el efecto de Sortin2, en términos de la pérdida de la respuesta gravitrópica y la inhibición del crecimiento de la raíz, ocurren en plantas

adultas también. Se podría concluir, entonces, que el efecto de Sortin2 no se produce exclusivamente en estadios tempranos de desarrollo y que los fenotipos producidos a nivel de toda la planta y subcelularmente son inducibles.

El efecto de Sortin2 no sólo es inducible, sino que además es reversible. La deslocalización del facilitador PIN2 se revierte cuando las plantas son dispuestas en una condición control luego de ser tratadas con Sortin2, demostrado por datos que no fueron expuestos en este seminario de título. La reversibilidad de su efecto se observa también en términos del crecimiento de la raíz (Zouhar y col., 2004). Reversibilidad e inducibilidad son características que le permitirían a Sortin2 ser usado como una herramienta en investigaciones en biología celular vegetal, al producir efectos que son difíciles o imposibles de lograr mediante genética convencional, considerando la letalidad que tienen las mutantes en componentes del SE.

En levaduras, Sortin2 altera el sistema de endomembranas causando la secreción de la proteína CPY al medio extracelular (Norambuena y col., 2008). Los autores de Zouhar y col., 2004 describieron que Sortin2 altera la biogénesis de la vacuola en células de plántulas de *Arabidopsis*. En conjunto esta evidencia indicaría que el mecanismo afectado por Sortin2 se encuentra a nivel subcelular por lo que se requeriría, entonces, que éste compuesto ingrese a la célula vegetal. La estructura química del compuesto Sortin2 posee una región polar y una región apolar (figura 17), lo que le otorga afinidad por sistemas tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. La presencia de estos dominios, es sugerente de que éste compuesto es capaz de difundir por el tejido, entrar a la célula y producir su efecto a nivel celular.

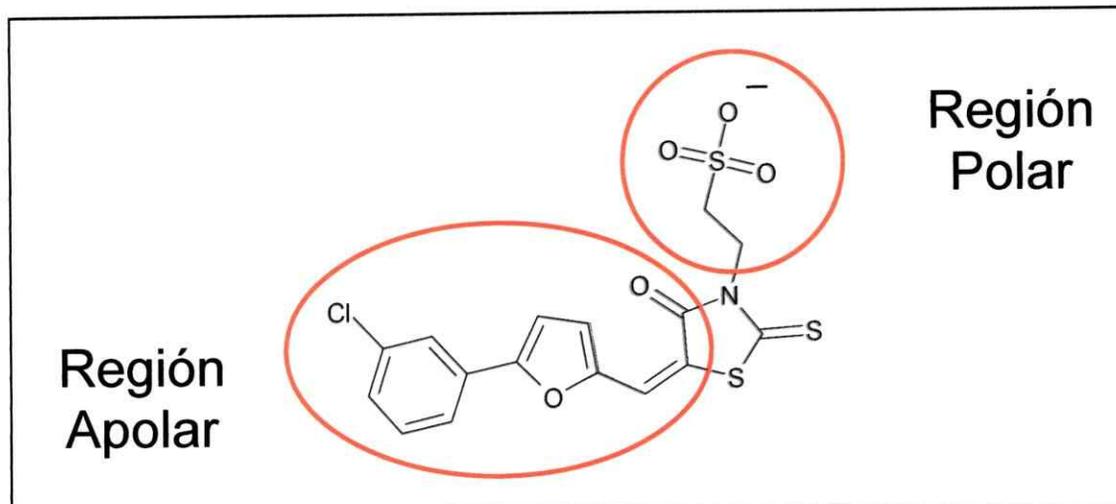


Figura 17. **Estructura química de Sortin2.** En círculo rojo se muestra sobre la estructura química de Sortin2 hasta donde se extienden la región polar y la apolar. La presencia de esta última indicaría que el compuesto químico podría atravesar la membrana plasmática.

El desarrollo de plantas, está controlado por una exquisita regulación de diversas hormonas como auxinas, brasinosteroides, etileno, citoquininas, ácido abscísico, giberelinas, etc. Usualmente el control de las respuestas fisiológicas está dado por un equilibrio entre dos o más hormonas. En una investigación futura sería interesante estudiar efecto de Sortin2 sobre vías de señalización de hormonas distintas de auxina, ya que el compuesto Sortin2 podría afectar también la señalización de otras hormonas (además de auxina). Resultados de este seminario de título muestran que Sortin2 altera la localización del marcador BRI1:GFP. BRI1 es un receptor de brasinosteroides y está involucrado en la señalización de esta hormona. Se sabe que el tráfico endocítico de este receptor es importante en la transducción de la señal hormonal. El hecho de que Sortin2 altere localización de BRI1 resulta ser una evidencia que sustenta la importancia de analizar el efecto de Sortin2 en la señalización de los brasinosteroides en plantas.

Diversas razones apoyan estudiar el efecto de Sortin2 en la transducción de señales de auxinas. En primer lugar, los fenotipos de inhibición del crecimiento de la raíz y pérdida del gravitropismo que Sortin2 provoca en las plantas tratadas, están fuertemente ligadas con el señalamiento de auxinas. Drogas como brefeldina A y wortmanina alteran el correcto transporte de auxinas y producen fenotipos con las mismas características. Por último en Vieten y col., 2007, se plantea que el común denominador de los diversos procesos fisiológicos en los que participan las auxinas, es el mecanismo PAT. Como se observó en este seminario de título, PAT se ve afectado por acción de Sortin2, en términos de la localización de los facilitadores de auxina PIN1 y PIN2, lo que sugiere que Sortin2 afecta a PAT explicando los fenotipos obtenidos en la planta.

#### **4.2 Sortin2 inhibe la respuesta a auxina.**

La evaluación de la capacidad de Sortin2 de inhibir la activación del promotor DR5, causada por auxina, se logró con el sistema reportero GUS. Este sistema fue propuesto por Jefferson y col., 1987 y desde entonces ha sido ampliamente utilizado en plantas como un sistema reportero de expresión génica. GUS es una enzima estable, cuya actividad no ha sido detectada en plantas. El ensayo enzimático de GUS es sencillo y además actúa sobre una variedad de sustratos con disponibilidad comercial (Jefferson y col., 1989). Uno de los inconvenientes del ensayo histoquímico de GUS es que es cualitativo y por tanto los resultados están sujetos a la capacidad del observador de diferenciar la intensidad de la coloración. Por eso, los resultados se complementaron con un ensayo cuantitativo que usa a MUG como sustrato.

Utilizando el ensayo cuantitativo fluorométrico existe la posibilidad de que la enzima reportera  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) esté siendo directamente inhibida por Sortin2,

por ejemplo por unión química al sitio activo de la enzima. En nuestro laboratorio, sin embargo, se provó que Sortin2 también disminuye los niveles de respuesta a auxina usando plantas que usan como reportero a la proteína fluorescente verde (GFP) en vez de a la enzima GUS (sistema reportero DR5::GFP). Dado que Sortin2 tiene el mismo efecto usando dos proteínas reporteras distintas sería muy improbable que el efecto observado sea debido en los niveles de respuesta a auxina sea por un mecanismo de inhibición directa de la proteína reportera.

La inhibición que causa Sortin2 es sobre la auxina exógena aplicada en el tratamiento. Independiente del tipo de auxina usada, sintética ó natural, sabemos que son capaces de activar al promotor DR5, ya que aumentan la activación 5 veces con respecto a la condición control. La auxina exógena, entonces, tiene la capacidad de ingresar a la planta y ser conducida hasta donde ejerza su efecto; activar al promotor DR5.

Los tratamientos con Sortin2 no muestran diferencias con la condición control indicando que éste no incide en la activación del promotor DR5. Con esto se descarta la posibilidad de que el compuesto Sortin2 esté compitiendo con la auxina. Un mismo sitio de unión en la molécula receptora podría estar siendo compartido por auxina y Sortin2, pero ya que éste no activa la señal de auxina, es más probable que Sortin2 inhiba la señalización en un punto previo de la vía, como lo es la movilización de la auxina hasta el lugar de acción fisiológica.

Todas las auxinas, sintéticas o naturales, provocan el mismo efecto fisiológico a pesar de las diferencias que poseen en su estructura química. Para evaluar el efecto de Sortin2 sobre la respuesta a auxina fue necesario usar diferentes concentraciones

de estas hormonas, para lograr la misma activación de DR5. Esto indica que ciertas auxinas tienen una potencia activadora mayor que otras. Las concentraciones escogidas son extensamente usadas en la literatura para evaluar los efectos fisiológicas de las hormonas (Rahman y col., 2002).

#### **4.3 Localización de facilitadores de eflujo PIN1 y PIN2**

La localización polar de los facilitadores de eflujo es un fenómeno muy bien descrito (Kleine-Vehn y Friml, 2008; Feraru y Friml, 2008), pero su visualización se puede ver dificultada por variaciones técnicas al momento de tomar las imágenes en el microscopio confocal. Por eso fue importante realizar estudios de localización en condiciones controles antes de analizar los efectos provocados por Sortin2 en la localización polarizada de estas proteínas. En las colecciones en el plano Z de PIN2:GFP y PIN1:GFP, los facilitadores están localizados de una manera polar. Esa polarización se hace más evidente en ciertos planos focales que en otros. En algunos planos focales pareciera no observarse esta polarización, pero es justamente en estos planos donde se permite observar más detalles intracelulares. Dhonukshe, y col, 2007 demostraron la endocitosis de facilitadores PIN usando para sus análisis microscópicos justamente estos planos focales donde la localización polar no se puede apreciar. Por todo esto, las comparaciones entre plantas tratadas con Sortin2 y control fueron realizadas usando los mismos parámetros de manipulación del microscopio confocal. Se consideró también comparar planos focales análogos.

Como se comentó antes, brefeldina A (BFA) produce efectos fisiológicos similares a los que produce Sortin2; pérdida de gravitropismo e inhibición del crecimiento de la raíz. Subcelularmente, BFA altera la localización de PIN1 localizando a esta proteína en cuerpos intracelulares denominados cuerpos de BFA en donde PIN1

se acumula (Geldner y col., 2001). Los cuerpos encontrados en presencia de Sortin2 presentan una morfología distinta a los cuerpos observados en tratamientos con BFA. Por lo tanto, Sortin2 y BFA tienen un efecto distinto y por tanto probablemente un blanco celular y molecular distinto.

La proteína GNOM codifica para un regulador del transporte vesicular y es el blanco molecular de BFA en plantas (Geldner y col., 2001). En efecto, mutantes *gnom* no presentan localización polar de los facilitadores de eflujo PIN1. BFA y Sortin2 alteran la localización de los facilitadores de eflujo, sin embargo provocan acumulación de los facilitadores de auxina en cuerpos distintos lo que sugiere que sus blancos moleculares serían distintos. Si bien se desconoce el blanco molecular de Sortin2, nuestros resultados sugieren que sería uno distinto a la proteína GNOM.

Sortin2 afecta la localización polar de PIN1 y PIN2 y más aún, esta alteración se produce también en otras proteínas de membrana como BRI1. Tanto BRI1 como PIN1 y PIN2 reciclan a través de la vía endocítica, entre la membrana plasmática y el sistema endosomal (Geldner y col., 2007). Sortin2, entonces, estaría afectando el tráfico que existe entre estos dos compartimentos.

Los tratamientos con oscuridad inducen la acumulación de PIN2 en la vacuola. Los autores de Laxmi y col., 2008 probaron usando inhibidores de síntesis de proteína que la destinación de PIN2 a vacuola se produce, a pesar de la inhibición de la síntesis *de novo*. Este antecedente sugiere que la proteína que se acumula proviene desde el pool que se encuentra en la membrana plasmática. Los tratamientos con Sortin2 provocaron que PIN2 se acumule en compartimentos que se asemejan a vacuola. Más interesante aún, cuando observamos la aparición de cuerpos intracelulares de gran

tamaño, no se observa simultáneamente una notoria presencia de PIN2 en la membrana plasmática, sugiriendo que el tráfico desde la membrana es el que está siendo afectado, al igual que en tratamientos con oscuridad.

Sortin2 altera la biogénesis de vacuola en plantas e induce, en levaduras, el tráfico al medio extracelular de la proteína con destinación a vacuola CPY. Ambos procesos, biogénesis de vacuola y destinación de CPY, se llevan a cabo usando los componentes de la vía secretoria del SE (flecha punteada amarilla en la figura 18). Por otro lado, resultados de este seminario de título muestran la capacidad de Sortin2 de alterar la vía endocítica del SE (flecha punteada roja en la figura 18) induciendo la acumulación de proteínas PIN en cuerpos intracelulares similares a vacuola, fenómeno que también es inducido por los tratamientos con oscuridad. Considerando el efecto de Sortin2 sobre tanto la vía endocítica como la secretoria, sería sugerente que Sortin2 podría alterar a mecanismos compartidos entre estas dos vías. El componente del SE, que intersecta las vías secretorias y endocíticas, es el compartimento pre-vacuolar (PVC).

En la figura 18 se presenta un modelo que esquematiza el mecanismo por el cuál Sortin2 estaría actuando. Como se mencionó anteriormente, Sortin2 provoca una alteración del tráfico vesicular del sistema de endomembranas. La alteración en el SE provoca una deslocalización de las proteínas facilitadoras PIN, lo que alteraría el transporte de la hormona auxina y por tanto su señalización. Esto se reflejaría a nivel fenotípico en el organismo completo.

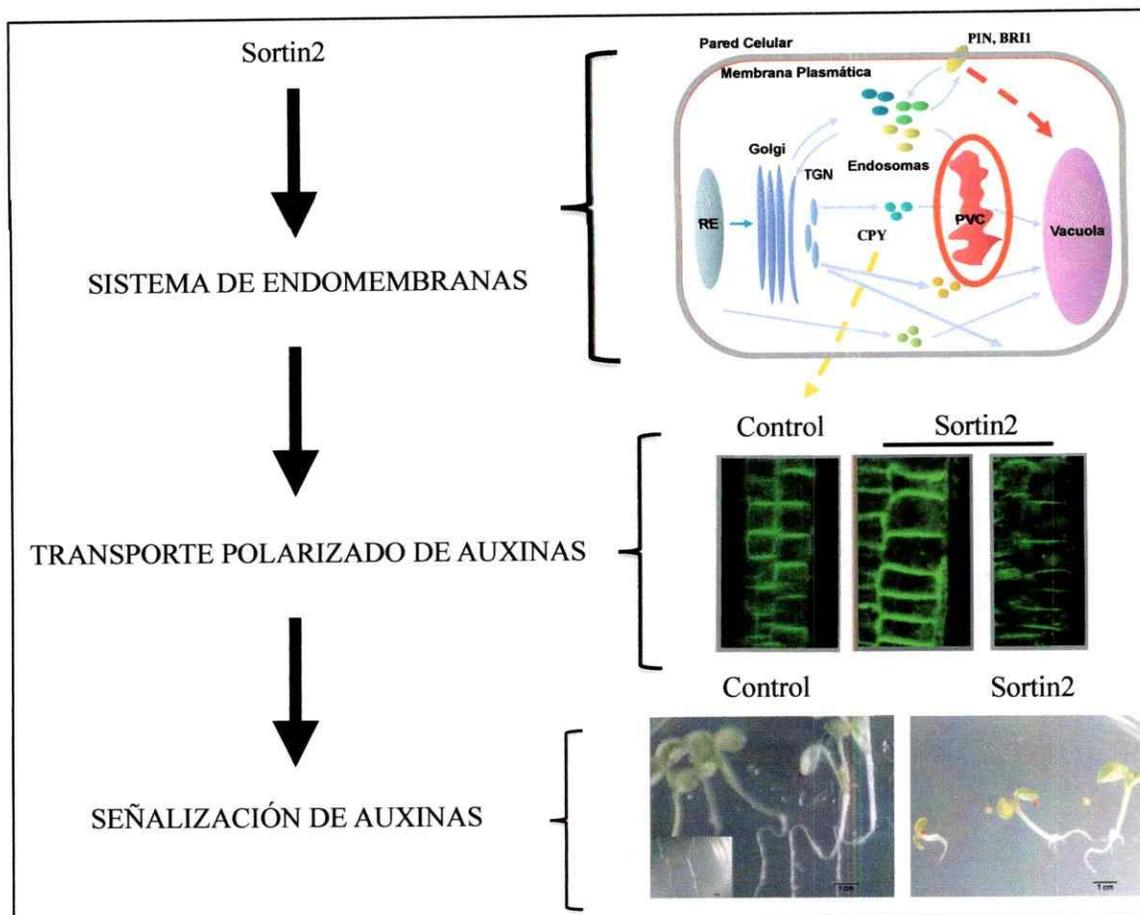


Figura 18. **Modelo propuesto del mecanismo de acción de Sortin2.** Sortin2 provoca una alteración en el tráfico vesicular del sistema de endomembranas (SE). El blanco celular de Sortin2 que se propone es el compartimento pre-vacuolar (PVC), por ser un componente del SE que participa tanto en el tráfico endocítico como secretorio, ambas vías alteradas por Sortin2. Una alteración en el tráfico del SE provoca la localización anormal de los facilitadores PIN. Esto impide el correcto establecimiento del transporte polarizado de auxinas, afectando su señalización e imposibilitándolas a ejercer el efecto fisiológico sobre el desarrollo de la planta.

## CONCLUSIONES

1. Sortin2 altera el crecimiento y la morfología de plántulas de *A. thaliana*
2. Sortin2 inhibe el crecimiento de la raíz y altera la respuesta gravitrópica en *A. thaliana*.
3. Sortin2 inhibe completamente la respuesta a auxina exógena, a nivel transcripcional, reportado por el sistema reportero DR5:GUS. Esta inhibición se produce tanto sobre auxinas naturales; IAA, como sintéticas; NAA y 2,4-D.
4. Sortin2 afecta la localización subcelular de los facilitadores de eflujo, PIN1 y PIN2.
5. Sortin2 altera la localización polar del facilitador de eflujo PIN2 y además causa la acumulación de este facilitador en compartimentos semejantes a vacuola.
6. Sortin2 no es específico para los facilitadores PIN, sino que además altera la localización de otras proteínas de membrana que también reciclan a compartimentos endosomales como BRI1.
7. Sortin2 altera la localización de BRI1 sugiriendo que otras señalizaciones, distintas de auxina, están siendo alteradas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bennett, M., Marchant, A., Green, H., May, S., Ward, S. y Millner, P. (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**: 948-950.
- Delker, C., Raschke, A. y Quint, M. (2008). Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta*, **227**: 929-941.
- Dhonukshe, P., Grigoriev, I., Fischer, R., Tominaga, M., Robinson, D. y Hasek, J. (2008). Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 4489-4494.
- Dhonukshe, P., Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mähönen, A. y Prasad, K. (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature*, **456**: 962-966.
- Feraru, E. y Friml, J. (2008). PIN polar targeting. *Plant physiology*, **147**: 1553-1559.
- Fior, S., Vianelli, A. y Gerola, P. (2009). A novel method for fluorometric continuous measurement of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity using 4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) as substrate. *Plant Science*, **176**: 130-135.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H. y Hamann, T. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*, **426**: 147-53.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y., Jürgens, G. y Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**: 425-428.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T. y Murfett, J. (1998). How does auxin turn on genes? *Plant physiology*, **118**: 341-347.
- Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miège, C., Rollin, C. y Gaude, T. (2006) AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature*, **443**: 106-109
- Kleine-Vehn, J. y Friml, J. (2008). Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annual review of cell and developmental biology*, **24**: 447-473.
- Laxmi, A., Pan, J., Morsy, M. y Chen, R. (2008). Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, **3**: 1510.
- Leonelli, S. (2007). Arabidopsis, the botanical Drosophila: from mouse cress to model organism. *Endeavour*, **31**: 34-38.

- Norambuena, L., Zouhar, J., Hicks, G. y Raikhel, N. (2008). Identification of cellular pathways affected by Sortin2, a synthetic compound that affects protein targeting to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC chemical biology*, **8**: 1-8
- Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J., Abas, M. y Seifertová, D. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, **312**: 914-8.
- Rahman, A., Hosokawa, S., Oono, Y., Amakawa, T., Goto, N. y Tsurumi, S. (2002). Auxin and ethylene response interactions during Arabidopsis root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant physiology*, **130**: 1908-1917.
- Rashotte, A., Brady, S., Reed, R., Ante, S. y Muday, G. (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of Arabidopsis. *Plant physiology*, **122**: 481-490.
- Samaj, J., Baluska, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D. y Menzel, D. (2004). Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant physiology*, **135**: 1150-1161.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B. y Yang, Y. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature cell biology*, **10**: 946-954.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. Editorial Sinauer. Capítulo 19. Tercera Edición
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, **9**: 1963-1971.
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. y Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in plant science*, **12**, 160-168.
- Weigel, D. y Jürgens, G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature*, **415**: 751-754.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P., Ruzicka, K. y Blilou, I. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, **312**: 883.
- Zhao, Y., Christensen, S., Fankhauser, C., Cashman, J., Cohen, J. y Weigel, D. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, **291**: 306-309.
- Zhao, Y., Dai, X., Blackwell, H., Schreiber, S. y Chory, J. (2003). SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science*, **301**: 1107-1110.
- Zouhar, J., Hicks, G. y Raikhel, N. (2004). Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 9497-9501.