

UCH-Fc
Biotecnología
N 822
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

Caracterización funcional de AtClc1:

una posible cadena liviana de clatrina de *Arabidopsis thaliana*.

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

Beatriz Genoveva Vásquez Soto

Director de Seminario de Título: Dra. Lorena Norambuena.

Septiembre, 2013

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Beatriz Genoveva Vásquez Soto**

**“Caracterización funcional de AtClc1:
una posible cadena liviana de clatrina de *Arabidopsis thaliana*”**

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

Dra. Lorena Norambuena
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Marco Tulio Núñez
Presidente Comisión

Dr. Michael Handford
Evaluador



Santiago de Chile, Septiembre de 2013

BIOGRAFÍA



Nací en junio de 1989 en la hermosa ciudad de Chillán. Crecí bajo la rigurosa y estricta crianza de mi madre Cristina Soto y la fiel complicidad y amistad de mi padre Wenceslao Vásquez. Ambos me regalaron una hermosa hermana, la Mari, quien me esperaba al momento de nacer con sus bracitos abiertos para cuidarme y defenderme de cualquier adversidad. Mi enseñanza básica la viví en el colegio Santa María, donde se me inculcó el don de la Fe en Dios, el amor a la vida y el respeto por los demás. Mi enseñanza media transcurrió en el colegio Padre Hurtado, donde conocí a mis grandes amigas, al chico más guapo del mundo y a mis dos hermanos de la vida Pablo y Nico. En este colegio descubrí la importancia de la participación de cada persona en el destino de nuestra sociedad y cómo la felicidad del mundo se gesta desde nuestro propio lugar de trabajo, familia y entorno. Aquí aprendí lo importante que es seguir la vocación y que la única forma de ser felices es recorrer el camino que realmente se desea seguir. Porque la felicidad no es un fin, sino un estado permanente de la vida. En busca de mi vocación, asistí a escuelas de verano de la Universidad de Chile, donde descubrí mi interés por la biología celular y decidí ingresar a Ingeniería en Biotecnología en la misma casa de estudios. Durante mi paso por La Chile descubrí el valor de las ideas, creencias y pensamientos de los demás. Aprendí que en la diversidad está la belleza del mundo, lo que me ha hecho ser día a día más tolerante. Aquí nació realmente mi amor por la biología y descubrí que desarrollarme en el mundo de la ciencia me hace ser plenamente feliz.



**Dedicada a mi Padre,
porque nunca dejé de pensar en ti
mientras escribí esta Tesis.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, por haber sido parte de todo este proceso universitario. A mi mamá por inculcarme el hábito de la responsabilidad... por esperarme con la comida más rica del mundo en mis viajes a Chillán... por venir a Santiago a verme para los cumpleaños en que yo no podía viajar...y por rezar todas las noches por mí para que Diosito me cuidara. A mi papá por trabajar todos los días para poder regalarme los estudios... por creer ciegamente en mí y en mis capacidades... por apañare en todas las ideas, viajes, pololeos y experiencias que se me ocurrió vivir durante este tiempo... por devolver todos los llamados telefónicos y mover cielo, mar y tierra en los casos en que lo necesité. A mi hermana por ser la mejor hermana del mundo...por estar siempre pendiente de mí... por esperarme con lindas sorpresas en la casa... y por cuidar a los papás en Chillán. Al Pablo por ser como el hermano mayor (aunque de mayor no tiene nada) y darme consejos como buen experto en el arte del amor. Al Nico, por llenar nuestro hogar de alegrías y hacer de mis vacaciones mucho más entretenidas. Y a mi abuelita María por acordarse de todos los cumpleaños, santos y fechas importantes... por tejerme mañanitas, guantes y chalecos para el frío... y por mandarme embelecocos, alfajores y queques cada vez que se podía.

También agradezco a mi familia de mi pensión de Santiago... A la Sra. Silvia por ser mi mamá postiza... por cuidarme cuando me enfermaba, por alimentarme bien todos los días, por prepararme la leche del desayuno y mandarme el almuerzo a la U. A Dn. Leo, Sarita, Pipe y Esteban, por hacer de la casa un lugar más...especial. A mis

compañeros de pensión, en especial a Felipe, Leyla, Nicole y Pablo, por escuchar mis historias de todos los días y compartir una chelita en las semanas de estrés.

Agradezco a mis amigas de la vida.... Ale, Polli, Chelo, Nela, Feña, Clau... por mantenerse siempre en contacto, aconsejarme y escucharme siempre que lo necesité.

Al Mauri... mi amigo incondicional y alma gemela.

A mis amigos de la U que siempre estuvieron ahí para conversar, desestresarse, estudiar y hacerme feliz día a día... en especial a Clío, Cathy, Naty Cri, Arito, Herni, Isma, Rulo, Joel, Mati, Vale, Maca, Nicole, Talo y Juanjo.

A mis profesores de la U... en especial a mis primeros tutores... Dr. José Pizarro y Dr. Julio Alcayaga. A todos quienes trabajan en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, por hacer del Lab un lugar muy buena onda y permitirme ser yo misma día a día. Especialmente agradezco a Lore, Pato, Mati F., Aliosha, Carlitos, Yu, Diego, Fran, Dani U., Solange, Claudio y Nía, por su amistad sincera reflejada en el día a día de trabajo... Agradezco enormemente a Norambuena's Lab, por su espíritu crítico y enseñarme a ser pulcra con mi trabajo. Y a la profe Lore, por creer en mis capacidades y enseñarme a potenciar mis resultados.

Finalmente, quiero agradecer a Dios por regalarme mi hermosa familia y llenar mi camino de grandes personas y felices momentos.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. RESUMEN.....	13
2. ABSTRACT.....	15
3. INTRODUCCIÓN.....	16
3.1 Aspectos Generales del Sistema de Endomembranas de una Célula Vegetal.....	16
3.2 Tráfico Vesicular Mediado por Clatrina: Importancia en el Desarrollo y Supervivencia de un Organismo Vegetal.....	18
3.3 Formación de una Vesícula con Envoltura de Clatrina.....	19
3.4 Estructura de Clatrina y el Papel Regulatorio de su Cadena Liviana.....	21
3.5 Importancia de la Cadena Liviana de Clatrina en la Fisiología Celular.....	23
3.6 Cadena Liviana de Clatrina y su caracterización en <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
3.7 Estudio de AtCLC1 en un Sistema Heterólogo: Sobreponiéndose a la Redundancia Génica y Funcional.....	27
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS.....	29
5.1 Objetivo General.....	29
5.2 Objetivos Específicos.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 Material Biológico.....	30
6.1.1 Línea de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizada.....	30
6.1.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	30
6.1.3 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
6.2 Trabajo con <i>Escherichia coli</i>	32
6.2.1 Condiciones de cultivo bacteriano.....	32

6.2.2 Obtención de <i>E. coli</i> quimiocompetentes.....	32
6.2.3 Transformación de <i>E. coli</i> por medio de golpe térmico.....	33
6.3 Trabajo con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
6.3.1 Condiciones de cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	33
6.3.2 Obtención de <i>S. cerevisiae</i> electrocompetentes.....	34
6.3.3 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> por medio de electroporación.....	34
6.4 Extracción de ácidos nucleicos de microorganismos.....	35
6.4.1 Extracción de ARNm de levaduras nativas (WT)	35
6.4.2 Extracción de ADNg de levaduras nativas.....	36
6.4.3 Extracción de ADN plasmidial desde <i>E. coli</i>	36
6.5 Cuantificación y análisis de ácidos nucleicos.....	37
6.5.1 Cuantificación de ARNm y ADNg.....	37
6.5.2 Cuantificación de ADN plasmidial.....	38
6.5.3 Análisis de ADN amplificado por medio de reacciones de PCR.....	38
6.5.4 Análisis de ADN plasmidial previamente digerido con enzimas de restricción.....	39
6.6 Reacciones de RT-PCR, PCR y secuenciación.....	39
6.6.1 Genotipificación de las cepas <i>S. cerevisiae clc1</i> y <i>vps41</i>	39
6.6.2 Aislamiento de las secuencias de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1.....	42
6.6.3 Reacciones de PCR de colonias de <i>E.coli</i>	44
6.6.4 Secuenciación de vectores pCR8.....	45
6.7 Digestiones enzimáticas de ADN plasmidial.....	45
6.7.1 Digestión enzimática del vector pCR8-ScCLC1.....	45
6.7.2 Digestión enzimática de los vectores de expresión constitutiva en levadura.....	46
6.8 Diseño y construcción de vectores.....	47
6.8.1 Clonación de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en el vector pCR8/GW/TOPO.....	47
6.8.2 Construcción de vectores de expresión constitutiva de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en levadura.....	48

6.9 Análisis de expresión de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 fusionadas a HA y EGFP, en <i>S. cerevisiae</i>	49
6.9.1 Extracción de proteínas totales desde <i>S. cerevisiae</i>	49
6.9.2 Detección de proteínas de fusión a HA o EGFP por medio de Western Blot.....	50
6.10 Análisis de la localización subcelular de las proteínas de fusión AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP en <i>S. cerevisiae</i>	51
6.11 Análisis de complementación heteróloga de AtClc1 en <i>S. cerevisiae clc1</i>	52
6.11.1 Ensayo de internalización de FM4-64 en <i>S. cerevisiae</i>	53
6.11.2 Análisis de fenotipo vacuolar en <i>S. cerevisiae</i>	53
6.11.3 Análisis de la cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	54
7. RESULTADOS.....	55
7.1 Clonación de las secuencias de ADN codificantes para las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1, en un vector bacteriano.....	55
7.1.1. Clonación de los ADNc de AtCLC1 y AtCLC2 en el vector pCR8/GW/TOPO.....	55
7.1.2. Clonación del ADNc de ScCLC1 en el vector pCR8/GW/TOPO.....	56
7.2 Obtención de vectores de expresión constitutiva de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en <i>S. cerevisiae</i>	60
7.3 Genotipificación de las cepas <i>S. cerevisiae clc1</i> y <i>vps41</i>	65
7.4 Obtención de <i>S. cerevisiae</i> silvestre y <i>clc1</i> que expresen constitutivamente las proteínas de fusión AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP.....	69
7.5 Obtención de <i>S. cerevisiae clc1</i> que expresen constitutivamente las proteínas de fusión AtClc1-HA, AtClc2-HA y ScClc1-HA.....	70
7.6 Determinación de la localización subcelular de AtClc1.....	72
7.7. Ensayo de complementación heteróloga de AtCLC1 en <i>S. cerevisiae clc1</i>	77
7.7.1 Evaluación de la capacidad de AtClc1-HA de revertir la menor tasa de endocitosis de <i>S. cerevisiae clc1</i>	78
7.7.2 Análisis de la capacidad de AtClc1-HA de complementar el fenotipo multivacuolar de la cepa <i>clc1</i>	82

7.7.3 Evaluación de la capacidad de AtClc1 de complementar la menor tasa de crecimiento presente en <i>S. cerevisiae clc1</i>	87
8. DISCUSIÓN.....	89
8.1 AtClc1 presenta un menor movimiento electroforético en un SDS-PAGE.....	89
8.2 AtCLC1-EGFP se localiza en el citoplasma de células de <i>Saccharomyces silvestre y clc1</i>	91
8.3 AtClc1-HA complementa parcialmente la menor tasa de endocitosis observada en <i>S. cerevisiae clc1</i>	93
8.4 La expresión de AtClc1-HA complementa el fenotipo multivacuolar de <i>S. cerevisiae clc1</i>	95
8.5 La expresión de AtClc1-HA no complementa la menor tasa de crecimiento observada en <i>S. cerevisiae clc1</i>	97
8.6 AtClc1 se comporta funcionalmente como una cadena liviana de clatrina, en <i>S. cerevisiae</i>	98
9. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	101
10.	
REFERENCIAS.....	103



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este Seminario de Título.....	30
Tabla II. Cepas de <i>Saccharomyces cerevesiae</i> utilizadas en este estudio.....	31
Tabla III. Partidores utilizados en las distintas reacciones de PCR de este Seminario de Título, detalladas en la sección 6.6.....	40
Tabla IV. Programas de PCR utilizados en este Seminario de Título, de acuerdo a lo descrito en la Sección 6.6.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tráfico vesicular mediado por CCVs dentro del SE de una célula vegetal.....	17
Figura 2. Formación de una vesícula con envoltura de clatrina (CCV).....	21
Figura 3. Comparación de secuencias polipeptídicas de distintas cadenas livianas de clatrina.....	26
Figura 4. Representación gráfica del proceso de internalización de FM4-64 en una célula de <i>Saccharomyces</i>	52
Figura 5. Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los partidores ScCLC1F y ScCLC1R.....	56
Figura 6. Determinación de la concentración óptima de MgSO ₄ para la amplificación de ScCLC1, utilizando la enzima Pfu ADN Polimerasa.	57
Figura 7. Determinación de la orientación de inserción de ScCLC1 en el vector pCR8-ScCLC1.....	58
Figura 8. Análisis de la orientación de inserción de AtCLC1 en los vectores pAtCLC1-HA y pAtCLC1-EGFP, por medio de digestión enzimática.	62
Figura 9. Determinación de la orientación de AtCLC2 en los vectores pAtCLC2-HA y pAtCLC2-EGFP, por medio de digestión con enzimas de restricción.	63
Figura 10. Análisis de la orientación de inserción de ScCLC1 en los vectores pScCLC1-HA y pScCLC1-EGFP, por medio de digestión con endonucleasas de restricción.....	64
Figura 11. Ensayo de resistencia a G418 de las cepas <i>S. cerevisiae</i> BY4742 <i>clc1</i> y <i>vps41</i> , adquiridas comercialmente.....	66
Figura 12. Genotipificación de la cepa <i>S. cerevisiae clc1</i>	67
Figura 13. Genotipificación de la cepa <i>S. cerevisiae vps41</i>	68
Figura 14. Análisis de la acumulación de proteínas de fusión de EGFP, de levaduras silvestre (WT) y <i>clc1</i> , transformadas con los vectores pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP y pScCLC1-EGFP.....	69

Figura 15. Análisis de la acumulación de proteínas de fusión a HA en levaduras transformadas con los vectores pAtCLC1-HA, pAtCLC2-HA y pScCLC1-HA.....	71
Figura 16. Análisis de la distribución subcelular de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 fusionadas a EGFP, en <i>S. cerevisiae</i> silvestre.....	73
Figura 17. Determinación de la distribución subcelular en <i>S. cerevisiae clc1</i> de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 fusionadas a EGFP.....	75
Figura 18. Evaluación de la cinética de endocitosis de FM4-64 en cepas de levaduras WT-si-HA, <i>clc1</i> -si-HA y <i>clc1</i> -ScCLC1-HA.....	79
Figura 19. Endocitosis de FM4-64 en <i>Saccharomyces clc1</i> -AtCLC1-HA y <i>clc1</i> -AtCLC2-HA.....	81
Figura 20. Análisis del fenotipo vacuolar de células de <i>Saccharomyces</i> WT-si-HA, <i>clc1</i> -si-HA y <i>vps41</i>	82
Figura 21. Análisis del fenotipo vacuolar en la población celular de <i>Saccharomyces clc1</i> -ScCLC1-HA, <i>clc1</i> -AtCLC1-HA y <i>clc1</i> -AtCLC2-HA.....	84
Figura 22. Distribución porcentual de las poblaciones celulares con fenotipos “A”, “B” o “C”, en las cepas de levadura WT-si-HA, <i>clc1</i> -si-HA, <i>clc1</i> -ScCLC1-HA, <i>clc1</i> -AtCLC1-HA, <i>clc1</i> -AtCLC2-HA.....	86
Figura 23. Análisis del crecimiento de las cepas WT-si-HA, <i>clc1</i> -si-HA, <i>clc1</i> -ScCLC1-HA, <i>clc1</i> -AtCLC1-HA, <i>clc1</i> -AtCLC2-HA.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico (g: genómico; c: complementario).
- ARN:** Ácido ribonucleico (m: mensajero).
- CCV:** Vesícula con envoltura de clatrina.
- Chc:** Cadena pesada de clatrina.
- CHC:** Gen codificante de cadena pesada de clatrina.
- Cle:** Cadena liviana de clatrina
- CLC:** Gen codificante de cadena liviana de clatrina.
- EGFP:** Proteína fluorescente verde.
- EMC:** Endocitosis mediada por clatrina
- GPD:** Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.
- HA:** Epítipo de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza.
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- PVC:** Compartimentos prevacuolares.
- SDS-PAGE:** Electroforesis de proteína en gel de acrilamida, en presencia de SDS.
- SDS:** Dodecilsulfato sódico.
- SE:** Sistema de endomembranas.
- TGN:** Red trans-Golgi.

1. RESUMEN

El sistema de endomembranas permite el correcto tráfico y localización de proteínas dentro de la célula. Entre las rutas de tráfico existentes, las vesículas con envoltura de clatrina median tanto la endocitosis, así como el movimiento desde la red trans-Golgi hacia los compartimentos prevacuolares. Clatrina es un complejo proteico consistente en tres cadenas livianas y tres cadenas pesadas, las que constituyen una estructura denominada triskelion. En *Arabidopsis* se han descrito tres posibles cadenas livianas de clatrina (AtClc), sin embargo, sólo AtClc2 ha sido estudiada por medio de ensayos directos. Este Seminario de Título se centra en el estudio funcional de AtClc1 como una posible cadena liviana de clatrina de *Arabidopsis*. Para responder a esta interrogante, se evaluó la capacidad de AtClc1 de complementar los fenotipos defectuosos de la mutante delecional de *Saccharomyces cerevisiae clc1*, la cual no expresa cadena liviana de clatrina (ScClc1). Esta mutante se caracteriza por presentar menor tasa de crecimiento y endocitosis, así como vacuolas fragmentadas. Los resultados expuestos en este Seminario muestran que AtClc1 fue capaz de acelerar la internalización de FM4-64 en la cepa *clc1*, al igual que AtClc2. Adicionalmente, la expresión de AtClc1 disminuyó significativamente el fenotipo vacuolar anormal, presente en levaduras *clc1*, lo cual también fue observado cuando AtClc2 fue expresado en la misma cepa. Sin embargo, ni AtClc1 o AtClc2 fueron capaces de revertir la menor tasa de crecimiento de la cepa *clc1*, lo cual muestra diferencias fisiológicas entre las Clc de *Arabidopsis* y ScClc1. Consistentemente, AtClc1 se localizó en el citoplasma de células de *S. cerevisiae clc1*, así como AtClc2 y ScClc1. Interesantemente, AtClc1 mostró un mayor tamaño molecular al

teóricamente predicho en un SDS-PAGE, similar a lo descrito por otras Clc. En conclusión, los resultados de este Seminario demuestran que AtClc1 es capaz de comportarse funcionalmente como una Clc en *S. cerevisiae*, revelando la existencia de una segunda cadena liviana de clatrina en Arabidopsis.

2. ABSTRACT

The endomembrane system allows the proper trafficking and location of proteins within the cell. Among protein trafficking routes, clathrin-coated vesicles mediate both endocytosis and trans-Golgi to prevacuolar compartment trafficking. Clathrin is a protein complex that consists of three light and three heavy clathrin chains, which results in a structure called triskelion. Three putative clathrin light chains have been described in Arabidopsis (AtClc), only AtClc2 has been studied by direct functional assay. This seminar focuses on the functional study of AtClc1 as a clathrin light chain. To address this aim, the ability of AtClc1 to complement *Saccharomyces cerevisiae clc1*, which lacks the clathrin light chain (ScClc1), was analyzed. This mutant has slower growth and endocytosis ratio as well as fragmented vacuoles. Our results showed that AtClc1 was able to accelerate the FM4-64 internalization in *clc1* strain, as AtClc2. Moreover, expression of AtClc1 significantly abolished the abnormal vacuolar phenotype of *clc1* yeasts, which also was observed when AtClc2 was expressed. However, neither AtClc1 nor AtClc2 were able to revert the defective growth rate of *clc1* strain, showing a physiological difference to ScClc1. Consistently, AtClc1 was localized in the cytoplasm as well as AtClc2 and ScClc1. Interestingly, AtClc1 migrates with a higher molecular weight than theoretically predicted in a SDS-PAGE, similar to other Clc. Overall, our results demonstrate that AtClc1 is able to behave functionally as a Clc in *S. cerevisiae*, and reveal the existence of a second functional Clc in Arabidopsis.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Aspectos generales del sistema de endomembranas de una célula vegetal.

El sistema de endomembranas (SE), propio de los organismos eucariontes, es un conjunto de compartimentos subcelulares, que median la correcta síntesis y destinación de proteínas dentro de la célula. Entre los organelos que son parte de este sistema, se encuentra el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, los compartimentos prevacuolares (PVC), endosomas y vacuolas. A pesar de que la mayoría de estos componentes son comunes a la generalidad de las células eucariontes, existen algunos que son propios de determinados organismos (Nebenführ A., 2002). Particularmente, en las células vegetales se pueden encontrar distintos tipos de compartimentos vacuolares. Las vacuolas de almacenamiento de proteínas generan un reservorio de nutrientes en tejidos embrionarios los que son degradados durante la germinación de la semilla (Jiang L. y cols, 2001). Por otra parte, las vacuolas líticas presentan una función equivalente a los lisosomas en mamíferos y a la vacuola en levaduras, por lo que principalmente median la degradación de compuestos celulares (Marty F., 1999). Adicionalmente, las células vegetales pueden presentar una gran vacuola central que permite la mantención del turgor, el almacenamiento de metabolitos, así como la degradación de distintos constituyentes celulares (Marty F.,1999). Finalmente, otro compartimento que es propio de las células vegetales, es la placa celular, la cual se constituye en el centro de la célula con posterioridad a la mitosis, permitiendo la división del citoplasma (Samuels A. y cols., 1995).

El conjunto de organelos que conforman el SE, se comunican entre sí por medio de dos rutas de tráfico principales: la ruta secretoria y endocítica. Ambas son mediadas por la formación de vesículas, cuyo carácter depende de la membrana parental que las origina, el contenido que posean y el compartimento al cual son destinadas, lo cual permite que este proceso sea altamente regulado (Jürgens G., 2004; Figura 1).

La constitución de una vesícula se inicia en una región de una membrana parental, mediado por el ensamblaje de una maquinaria conformada por distintas proteínas

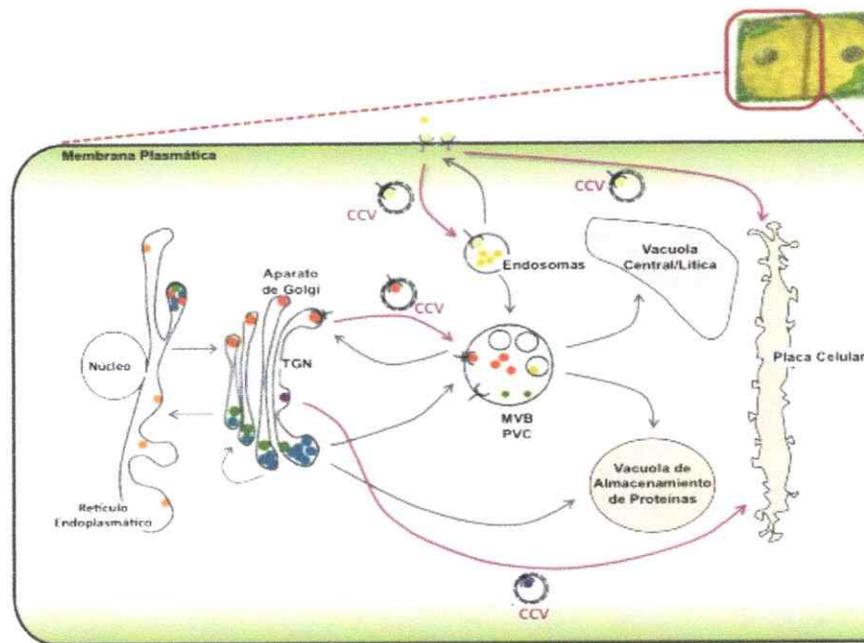


Figura 1. Tráfico vesicular mediado por CCVs dentro del SE de una célula vegetal. Detalles del SE y rutas de tráfico vesicular de una célula vegetal en división (recuadro rojo). Los distintos compartimentos que constituyen este sistema, se comunican entre sí por medio de distintas rutas de tráfico vesicular (flechas). En particular, las CCVs permiten la internalización de elementos desde el espacio extracelular, así como el movimiento anterógrado de proteínas desde TGN hacia MVB y PVC (flechas moradas). CCV, vesículas con envoltura de clatrina. TGN, red trans-Golgi. MVB, cuerpos multi vesiculares. PVC, compartimentos pre-vacuolares. Modificado de Paul M. y Frigerio L., 2007.

(Hughson F., 2010). Tales proteínas permiten la deformación de la membrana hacia el citoplasma celular y la consiguiente formación y escisión de la vesícula (Kirchhausen T., 2000). Particularmente, a partir de la red trans-Golgi (TGN) se originan vesículas con envoltura de clatrina (CCVs) las cuales son destinadas a PVC, formando parte de la ruta secretoria. Desde PVC, el contenido puede ser direccionado hacia la membrana plasmática o dar origen a una vacuola lítica y posteriormente a la vacuola central. Las CCVs también forman parte de la ruta endocítica, originándose a partir de la membrana plasmática y permitiendo la internalización de diversos componentes extracelulares (Chen X. y cols, 2011; Figura 1). De esta forma, las CCVs forman parte tanto del tráfico endocítico así como de la ruta secretoria, constituyendo uno de los principales elementos que media el tráfico intracelular (Figura 1. Flechas moradas).

3.2. Tráfico vesicular mediado por clatrina: importancia en el desarrollo y sobrevivencia de un organismo vegetal.

La Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) ha sido descrita como la principal ruta de internalización de proteínas residentes de la membrana plasmática, en células vegetales (Dhonukshe P. y cols., 2007). Dado lo anterior, la EMC controla diversas vías de señalización, las cuales gatillan o inhiben distintas respuestas a nivel celular y sistémico. Un ejemplo de esto, es lo que ocurre entre la interacción planta-patógeno. Muchos patógenos liberan moléculas denominadas “elicitores”, los cuales son reconocidos por medio de receptores específicos presentes en la superficie de la célula vegetal (Dangl J. y cols., 2001). Recientes evidencias muestran una importante

participación de la EMC en la señalización celular, provocada por la presencia del elicitador criptogéina, de modo que cuando ésta es inhibida, los niveles de expresión de los genes de respuesta a patógeno se ven fuertemente disminuidos (Adam T. y cols., 2012). Por otra parte, la EMC permite la existencia de una distribución asimétrica de ciertas proteínas transportadoras en la membrana plasmática (Nagawa S. y cols., 2012; Kitakura S. y cols., 2011). Debido a esto, se establece una polaridad celular en ciertos tejidos de la planta, la cual es fundamental para el correcto desarrollo del organismo vegetal. Un ejemplo claro de esto, es el transporte polarizado de la hormona auxina, el cual se constituye gracias a una localización asimétrica de sus transportadores en la célula vegetal. Cuando el flujo polarizado de dicha hormona se ve interrumpido, la raíz de la planta presenta una elongación aberrante, con pérdida de la respuesta gravitrópica y déficit de raíces laterales (Kitakura S. y cols., 2011). Más significativo aún, es el hecho de que las plantas que carecen de clatrina son inviables y aquellas que presentan una disminución en algunas de las proteínas que conforman la estructura de este complejo proteico, muestran una división celular y desarrollo embrionario aberrante (Kitakura S. y cols., 2011). Estos fenotipos se fundamentan principalmente, en la participación que tiene el transporte mediado por clatrina, en la formación de la placa celular, tanto a nivel endocítico así como también desde TGN (Van Damme D. y cols., 2011).

3.3 Formación de una vesícula con envoltura de clatrina.

El mecanismo por el cual se forma una CCV ha sido principalmente estudiado en células de mamífero y levaduras (McMahon H. y Boucrot E., 2011). Por otra parte, las investigaciones realizadas en organismos vegetales son más recientes y revelan

que muchos de los componentes moleculares que participan en este proceso, son evolutivamente conservados (Chen X. y cols., 2011; Holstein S., 2002; Scheele U. y Holstein S., 2002).

La formación de una CCV implica un ensamblaje continuo de proteínas en una región localizada de la membrana de origen. Este proceso comienza con el reclutamiento de proteínas de unión a Fosfatidil-Inositol-4,5-Bifosfato (PIP2) en zonas de la membrana ricas en este fosfolípido (Figura 2.A; Bar M. y cols., 2008; Barth M. y Holstein S., 2003). Conjuntamente, proteínas adaptadoras (APs) son reclutadas en estas regiones, asociándose a proteínas cargo, lo que provoca una leve curvatura de la membrana (Maldonado-Mendoza I. y Nessler C., 1997; Feraru M. y cols., 2010). A su vez, clatrina polimeriza en estas regiones, ensamblando la envoltura de la vesícula e incrementando la deformación de la membrana parental (Figura 2.B; Edeling M y cols., 2006). Paralelamente, factores de nucleación de actina se asocian a esta región, permitiendo la polimerización del citoesqueleto e impulsando la vesícula hacia el interior del citoplasma (Figura 2.C; Collins A. y cols, 2011). Acto seguido, la GTPasa dinamina envuelve el cuello de la vesícula, permitiendo que ésta se escinda de su membrana de origen (Figura 2.D; Sundborger A. y cols, 2011). Finalmente, una vez que la vesícula ha sido liberada de la membrana parental, la envoltura de clatrina se desensambla, por medio del reclutamiento de la chaperona Hsc70 y de la defosforilación de PIP2 mediada por sinaptojanina (Figura 2.F; Eisenberg E. y Greene LE, 2007; Perera RM y cols, 2006). Así, quedan al descubierto las proteínas que mediarán la fusión de la vesícula con el compartimento blanco, permitiendo la correcta destinación de proteínas en la célula (McMahon H. y Boucrot E., 2011).

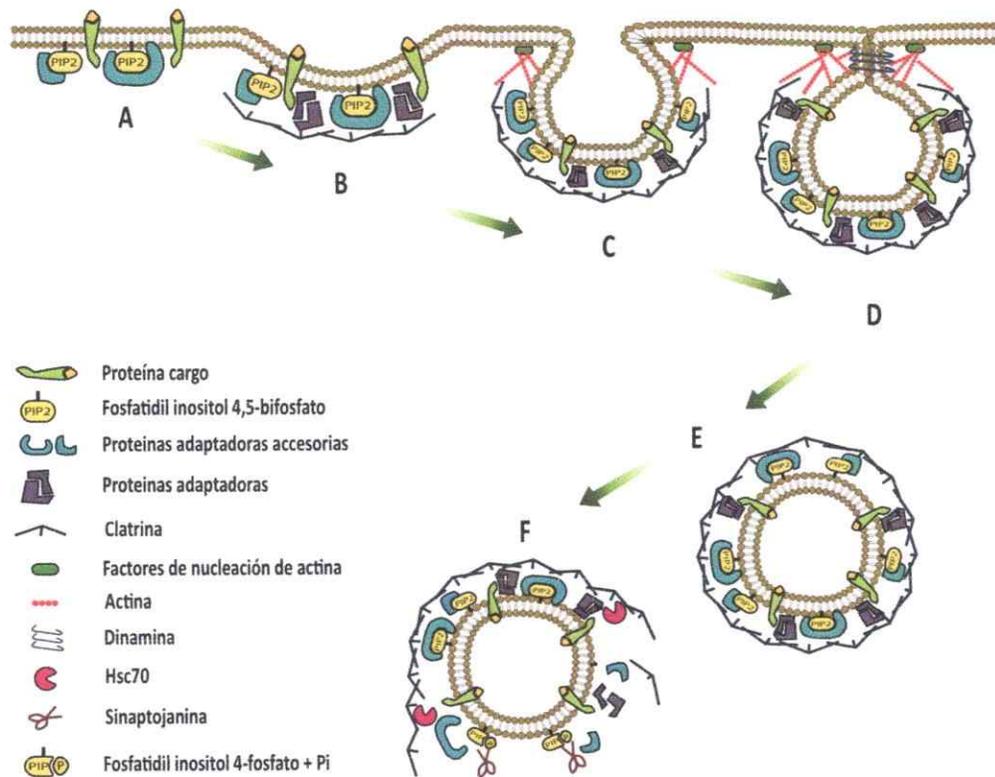


Figura 2. Formación de una vesícula con envoltura de clatrina (CCV). A) El proceso de formación de una CCV comienza con la unión de proteínas adaptadoras accesorias a fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP2). B) Posteriormente, proteínas adaptadoras reconocen proteínas cargo, permitiendo el reclutamiento de clatrina en esta región y la deformación de la membrana plasmática. C) Conjuntamente, factores de nucleación de actina permiten la polimerización del citoesqueleto en el cuello de la vesícula, impulsándola hacia el interior del citoplasma. D) La vesícula se escinde de la membrana de origen gracias a la acción de dinamina, la cual constriñe el cuello de ésta, permitiendo su liberación en el citoplasma (E). F) Finalmente, la envoltura de clatrina se desensambla, gracias a la ayuda de chaperonas (Hsc70) y la degradación de PIP2 mediada por sinaptojanina.

3.4 Estructura de clatrina y el papel regulatorio de su cadena liviana.

Clatrina es un complejo proteico constituido por la unión de tres cadenas pesadas (Chc, Clathrin Heavy Chain, en inglés) y tres cadenas livianas (Clc, Clathrin Light Chain, en inglés). Cada Clc (25KDa) se asocia a una Chc (190 kDa), de modo que en conjunto forman una estructura denominada Triskelion (Wilbur J. y cols., 2010; Fotín A. y cols, 2004; Kirchhausen T. y Toyo T., 1993).

En la región de trimerización de Chc y de una manera independiente de la presencia de Clc, tres Chc interactúan entre sí por medio del extremo C-Terminal de cada polipéptido (Fotin A. y cols, 2004; Liu S. y cols., 1995). En tanto, el segmento terminal de Chc, correspondiente al extremo N-Terminal de cada proteína, presenta una orientación hacia el interior de la envoltura de clatrina, de modo que interactúa con los complejos APs (Collette J. y cols., 2009).

Por otra parte, Clc se asocia a la región C-Terminal de Chc por medio de una región α -hélice central que comprende 71 residuos aminoacídicos aproximadamente (Fotin A. y cols, 2004). Al analizar la estructura de estas proteínas en la especie *Bos taurus*, se observa que los residuos W₁₀₈ y W₁₃₀ de Clcb, interactúan con los residuos K₁₃₂₆ y K₁₅₁₄ de Chc, respectivamente. Así, el extremo C-Terminal de cada Clc queda orientado hacia la región de trimerización, donde interactúa con dos de las tres Chc, favoreciendo la estabilidad del triskelion (Wilbur J. y cols., 2010; Fotin A. y cols., 2004).

Diversos estudios *in vitro* han documentado el papel regulatorio de Clc sobre el ensamblaje de una red de clatrina (Wilbur J. y cols. 2010; Ybe J. y cols., 1998; Liu S. y cols., 1995; Ungewickell E. y Ungewickell H., 1991). El más reciente de ellos corrobora el hecho de que ante la presencia de Clc, la constitución de esta red *in vitro* disminuye significativamente. Esto se debe a que Clc, puede interactuar condicionalmente con Chc por medio una segunda región localizada en su extremo N-Terminal, extendiendo la estructura de Chc. Al extenderse una Chc, disminuye la superficie de interacción entre dos Chc provenientes de triskelion distintos, de modo que existe un grado de pérdida de la estructura polihexagonal y pentagonal,

característica de esta red, dificultando la constitución de la envoltura de clatrina (Wilbur J. y cols. 2010).

3.5 Importancia de la cadena liviana de clatrina en la fisiología celular.

A pesar de que el ensamblaje *in vitro* del triskelion se logra de una forma independiente de Clc, estudios *in vivo* demuestran que la carencia de esta proteína tiene efectos fisiológicos importantes a nivel celular.

Saccharomyces cerevisiae, es un organismo unicelular que presenta en un su genoma la secuencia codificante para una Clc (ScClc1) y una Chc (ScChc1). Cuando esta levadura carece de ScClc1 (*clc1*), se observa una disminución de los niveles de triskelion constituidos por ScChc1, así como una menor tasa de endocitosis y crecimiento celular (Huang K. y cols, 1997). Estos fenotipos podrían deberse a que los niveles de ScChc1 caen diez veces en ausencia de ScClc1, respecto a la línea silvestre (Chu D. y cols, 1996). Sin embargo, cuando se recupera la expresión de ScChc1 en ausencia de ScClc1, sólo se revierte parcialmente la tasa de crecimiento, manteniendo reducidos los niveles de endocitosis, lo cual pone de manifiesto la existencia de una posible función de Clc independiente de Chc (Huang K. y cols, 1997).

Adicionalmente, Seeley E. y cols. (2002) mostró que, a diferencia de lo que ocurre en levaduras silvestres, donde existe una gran vacuola central, las células *clc1* presentan múltiples vacuolas de menor tamaño. Dada la importancia de clatrina en el transporte desde TGN, este fenotipo estaría dado por un déficit en el transporte de proteínas de fusión vacuolar (Seeley E. y cols., 2002).

Los distintos fenotipos aberrantes, observados en *S. cerevisiae clc1*, revelan la importancia de Clc para el funcionamiento de clatrina *in vivo*. Por otra parte, y tomando en consideración la relevancia de clatrina en el desarrollo vegetal, se vuelve interesante el estudio funcional de Clc en organismos de este reino.

3.6 Cadena liviana de clatrina y su caracterización en *Arabidopsis thaliana*.

Por medio de análisis bioinformáticos, el año 2002 se describieron por primera vez, tres posibles genes codificantes para cadenas livianas de clatrina en *A. thaliana*: AtCLC1, AtCLC2 y AtCLC3 (Scheele U. y Holstein S., 2002). En particular, AtClc1 es una proteína constituida por 338 residuos aminoacídicos, con un peso molecular teórico de 37kDa, el cual es considerablemente mayor al tamaño registrado por otras Clc. En tanto, AtClc2 y AtClc3 son proteínas constituidas por 258 residuos aminoacídicos, con un peso molecular teórico de 29KDa. Al revisar el alineamiento global de estas tres secuencias, realizado por Scheele U. y Holstein S. (2002), se observa que el mayor número de residuos aminoacídicos, que presenta AtClc1 por sobre AtClc2 y AtClc3, se distribuyen principalmente en su extremo C-terminal (Figura 3). Así, la posible región de unión a Chc de estas tres proteínas, permanece alineada al realizar este análisis global de secuencia (Figura 3). Interesantemente, al buscar en este alineamiento los residuos de interacción con Chc, W₁₃₀ y W₁₈₀, descritos por Fotín A. y cols. (2004), se observa que las tres posibles AtClc y ScClc1 muestran un alto grado de conservación de éstos (Figura 3, ver * y •). Adicionalmente, estas tres AtClc presentan residuos ácidos en su extremo N-terminal, correspondientes con los que han sido descritos como importantes en la regulación del ensamblaje del triskelion y la red de clatrina (Figura 3 en azul; Wilbur J. y cols.

2010; Scheele U. y Holstein S., 2002; Ybe J. y cols., 1998). Por otra parte, se ha descrito que al predecir la estructura secundaria de estas proteínas, todas muestran un patrón de alfa hélice en la región de unión con Chc, lo cual es congruente con lo descrito en otras Clc (Scheele U. y Holstein S., 2002).

A pesar que las tres posibles AtClc descritas por Scheele U. y Holstein S. (2002) mostraron características atribuibles a una Clc, este grupo ahondó su estudio en AtClc2. Sus resultados mostraron un 23,2% de identidad aminoacídica de AtClc2 respecto a la secuencia de ScClc1. En tanto, al analizar la región de unión a Chc, observaron que los porcentajes de identidad y similitud aminoacídica, comparado con ScClc1, eran de un 18,2% y 63,6%, respectivamente. Congruentemente con lo observado por análisis bioinformáticos, Scheele U. y Holstein S. (2002) mostraron que AtClc2 es capaz de interactuar con Chc proveniente de mamífero, en un sistema *in vitro*. En la actualidad, se sabe que AtClc2 interactúa con Chc2 de Arabidopsis (AtChc2) y que participa tanto en la ruta endocítica, así como en el transporte desde TGN hacia PVC (Ito E. y cols., 2012; Van Damme D. y cols., 2011; Konopka C. y cols., 2008). Sin embargo, estudios funcionales respecto a AtClc1 y AtClc3 no han sido documentados hasta el momento.



Figura 3. Comparación de secuencias polipeptídicas de distintas cadenas livianas de clatrina. Alineamiento global de las secuencias Clc de *Bos taurus* (Bt), *Arabidopsis thaliana* (At) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), realizado por Scheele U. y Holstein S. (2002). La región de unión a Chc, se señala en un recuadro rojo, mientras que con una línea azul, se subrayan los residuos ácidos, conservados en la región N-terminal de cada proteína. Se puede observar que el residuo W₁₀₈ de la secuencia BtClcb, el cual interactúa con BtChc (Fotín A. y cols., 2004), es conservado en todas las Clc analizadas (*). Adicionalmente el residuo W₁₃₀, el cual también interactúa con BtChc (Fotín A. y cols., 2004), es parcialmente conservado entre las secuencias alineadas (•). Modificado de Scheele U. y Holstein S., 2002.

Análisis de expresión génica en distintos estados de desarrollo y tejidos de *Arabidopsis*, revelan que AtCLC3 presenta bajos niveles de transcrito en la mayoría de los órganos de la planta, poniendo en cuestionamiento sus reales implicancias en la fisiología vegetal (Paul M. y Frigerio L., 2007; Schmid M y cols. 2005). En contraste, los niveles de expresión de AtCLC2 son significativamente más altos, tanto en los diferentes órganos, así como en sus distintos estados de desarrollo (Schmid M y cols. 2005). Interesantemente, a pesar de esta alta expresión génica, los niveles de transcrito de AtCLC2 se encuentran considerablemente reducidos en gránulos de polen, estructuras donde AtCLC1 muestra un significativo enriquecimiento en sus niveles de expresión (Schmid M y cols. 2005). Así, las diferencias en los niveles de

transcrito, sumado a la particularidad del evidente mayor tamaño molecular de AtClc1, deja abierta la posibilidad a la existencia de un grado de especialización funcional entre estas proteínas (Paul M. y Frigerio L., 2007).

De este modo, y considerando los antecedentes aquí expuestos, este Seminario de Título ha volcado su mirada en el estudio funcional de AtClc1. Congruentemente, la Hipótesis de esta investigación plantea que AtClc1 tiene la capacidad de comportarse funcionalmente como una Clc, de modo que media procesos celulares propios de clatrina.

3.7 Estudio de AtCLC1 en un sistema heterólogo: sobreponiéndose a la redundancia génica y funcional.

La existencia de tres posible genes codificantes para Clc en *A. thaliana* es, probablemente, un ejemplo más de los tantos que existen, sobre la redundancia génica característica de organismos vegetales (Bolle C. y cols., 2011). Tal característica, puede ir acompañada muchas veces, por una redundancia funcional, tomando complejo el estudio de genes aislados en el mismo organismo (Bolle C. y cols., 2011). Esto se debe a que plantas mutantes para un solo gen, no siempre muestran fenotipos evidentemente alterados, debido a que los demás genes parálogos compensan funcionalmente la carencia de éste (Bouché N. y Bouchez D., 2001).

Una de las estrategias ampliamente utilizadas para el estudio funcional de genes aislados, es la expresión de éstos en un sistema heterólogo que carezca de redundancia génica, acorde con el gen que se desea analizar (Yesilirmak F. y Sayers Z., 2009). Dentro de los organismos eucariontes, *S. cerevisiae* es uno de los más

empleados para desarrollar este tipo de estudios, debido a que su genoma contiene información para el desarrollo de la mayoría de las rutas metabólicas, generales a todos los eucariontes (Yesilirmak F. y Sayers Z., 2009). Por lo mismo, el estudio de sus distintos procesos fisiológicos y la constitución de rutas de tráfico dentro del SE, han sido abordados ampliamente. Sumado a lo anterior, su corto ciclo de reproducción y su fácil manejo, así como los múltiples sistemas de transformación génica y la amplia gama de librerías de mutantes *knock-out* existentes en la actualidad, vuelven a *S. cerevisiae* una excelente herramienta para el rápido estudio funcional de genes foráneos (Pettersson N. y cols., 2006; Van-Khue T. y Rao R., 2004)

Tomando en cuenta las ventajas de este sistema, la estrategia abordada en este Seminario de Título involucra la realización de un estudio de complementación heteróloga de AtCLC1 en *S. cerevisiae clc1*. Para llevar a cabo este análisis, se adquirieron comercialmente, cepas de levaduras con genotipo silvestre y carente de ScCLC1, en las que AtCLC1 fue expresado constitutivamente. Tanto el tamaño molecular de AtClc1, así como su localización subcelular, fueron determinados utilizando técnicas de Western Blot y microscopía confocal, respectivamente. El carácter funcional de AtClc1 fue evaluado analizando su capacidad de complementar algunos fenotipos aberrantes de *S. cerevisiae clc1*.

Así, el conjunto de estos resultados logran responder la Hipótesis planteada y entregar evidencia funcional de una segunda Clc en *A. thaliana*.

4. HIPÓTESIS

AtCLC1 se comporta funcionalmente como una cadena liviana de clatrina.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar *in vivo* la capacidad de AtClc1 de complementar los fenotipos aberrantes de la mutante de *S. cerevisiae clc1*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Construir vectores que permitan tanto la expresión constitutiva de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 en *S. cerevisiae*, así como su posterior detección por medio de Western blot y microscopía de fluorescencia.
2. Obtener *S. cerevisiae* silvestre y *clc1* que expresen constitutivamente las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1.
3. Analizar la localización subcelular de AtClc1 en *S. cerevisiae* y compararla con el comportamiento que presenta AtClc2 y ScClc1.
4. Evaluar la capacidad de AtClc1 de complementar los fenotipos defectuosos de la cepa *S. cerevisiae clc1* y contrastarlo con los efectos de ScClc1 y AtClc2 en la misma cepa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico.

6.1.1 Línea de *Arabidopsis thaliana* utilizada.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo col-0, fueron utilizadas para la extracción de ARNm, con el objetivo de clonar las secuencias codificantes de los genes AtCLC1 y AtCLC2, trabajo que fue realizado por la estudiante de doctorado Pamela Urrutia, en su unidad de investigación.

6.1.2 Cepas de *Escherichia coli*.

Se utilizaron cepas de *E. coli* DH5 α (Tabla I) para la amplificación de los vectores de clonación pCR8 (Sección 6.8.1) y de expresión en levadura pGPD (Sección 6.8.2). Las cepas de *E. coli* DH5 α obtenidas por medio de transformación, se detallan con su respectivo genotipo, en la Tabla I.

Debido a que los vectores de expresión en levadura sin inserto (sección 6.8.2), permiten la expresión de la toxina CcdB en bacterias, células de *E. coli* DB3.1, resistentes a CcdB,

Tabla I. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este Seminario de Título.

Cepa	Genotipo	Procedencia
DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^- , m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl5 Δ leu mil1	
DB3.1-si-HA	DB3.1; [pAG426GPD-ccdB-HA]	Este estudio
DB3.1-si-GFP	DB3.1; [pAG426GPD-ccdB-EGFP]	Este estudio
DH5 α	F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K^- m_K^-), λ^-	
DH5 α -ScCLC1	DH5 α ; [pCR8-ScCLC1]	Este estudio
DH5 α -AtCLC1	DH5 α ; [pCR8-AtCLC1]	Pamela Urrutia
DH5 α -AtCLC2	DH5 α ; [pCR8-AtCLC2]	Pamela Urrutia
DH5 α -ScCLC1-HA	DH5 α ; [pAG426GPD-ScCLC1-HA]	Este estudio
DH5 α -ScCLC1-EGFP	DH5 α ; [pAG426GPD-ScCLC1-EGFP]	Este estudio
DH5 α -AtCLC1-HA	DH5 α ; [pAG426GPD-AtCLC1-HA]	Este estudio
DH5 α -AtCLC1-EGFP	DH5 α ; [pAG426GPD-AtCLC1-EGFP]	Este estudio
DH5 α -AtCLC2-HA	DH5 α ; [pAG426GPD-AtCLC2-HA]	Este estudio
DH5 α -AtCLC2-EGFP	DH5 α ; [pAG426GPD-AtCLC2-EGFP]	Este estudio

fueron utilizadas para la amplificación de estos vectores (Tabla I).

6.1.3 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se utilizó como cepa nativa de *S. cerevisiae* la cepa BY4742 *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0* (WT, OpenBioSystem, Tabla II), para la extracción de ARNm, con el objetivo de clonar la secuencia codificante de ScCLC1. Adicionalmente, esta cepa fue transformada con los vectores pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP, pScCLC1-EGFP y pGPD-si-EGFP. Éstos vectores permiten la expresión de las correspondientes proteínas Clc fusionadas a EGFP (Sección 6.8.2, Tabla II), posibilitando el análisis de su distribución subcelular por medio de microscopía confocal.

La cepa *S. cerevisiae clc1* (OpenBioSystem, Tabla II), la cual presenta una delección del gen codificante para ScClc1, fue utilizada para estudiar la localización subcelular y la función de AtClc1, AtClc2 y ScClc1. Las células *clc1* fueron transformadas con los vectores de fusión a HA (pAtCLC1-HA, pAtCLC2-HA, pScCLC1-HA y pGPD-si-EGFP) y con los vectores de fusión a EGFP (pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP, pScCLC1-EGFP y pGPD-si-EGFP).

Tabla II. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Procedencia
WT	BY4742 <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	OpenBiosystem, Hunstville, AL
WT-ScCLC1-EGFP	WT; [pAG426GPD-ScCLC1-EGFP]	Este estudio
WT-AtCLC1-EGFP	WT; [pAG426GPD-AtCLC.1-EGFP]	Este estudio
WT-AtCLC2-EGFP	WT; [pAG426GPD-AtCLC.2-EGFP]	Este estudio
WT-si-HA	WT; [pAG426GPD-ccdB-HA]	Este estudio
WT-si-EGFP	WT; [pAG426GPD-ccdB-EGFP]	Este estudio
<i>clc1</i>	WT; <i>clc1Δ::kanMX</i>	OpenBiosystem, Hunstville, AL
<i>clc1</i> -ScCLC1-HA	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-ScCLC1-HA]	Este estudio
<i>clc1</i> -ScCLC1-EGFP	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-ScCLC1-EGFP]	Este estudio
<i>clc1</i> -AtCLC1-HA	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-AtCLC1-HA]	Este estudio
<i>clc1</i> -AtCLC1-EGFP	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-AtCLC1-EGFP]	Este estudio
<i>clc1</i> -AtCLC2-HA	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-AtCLC2-HA]	Este estudio
<i>clc1</i> -AtCLC2-EGFP	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-AtCLC2-EGFP]	Este estudio
<i>clc1</i> -si-HA	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-ccdB-HA]	Este estudio
<i>clc1</i> -si-EGFP	<i>clc1</i> ; [pAG426GPD-ccdB-EGFP]	Este estudio
<i>vps41</i>	WT; <i>vps41Δ::kanMX</i>	OpenBiosystem, Hunstville, AL

Adicionalmente, la cepa *S. cerevisiae vps41* (OpenBioSystem, Tabla II), delecional en el gen VPS41, fue utilizada como control positivo en los ensayos de complementación heteróloga de fenotipo vacuolar (Sección 6.11.2).

6.2 Trabajo con *Escherichia coli*.

6.2.1 Condiciones de cultivo bacteriano.

Las bacterias *E. coli* detalladas en la sección 6.1.2, fueron cultivadas a 37°C en medio Luria Bertani (LB) líquido (NaCl 1%, extracto de levadura 0,5%, triptona 1%, pH 7,0) con agitación constante. El medio sólido correspondió a LB suplementado con agar 1,5%.

Las bacterias transformadas con los vectores pCR8 (Sección 6.8.1), fueron seleccionadas y mantenidas en medio LB suplementado con espectinomicina (100mg/L). En tanto, para la selección de las bacterias transformadas con los vectores de expresión en levadura (Sección 6.8.2), se utilizó el antibiótico ampicilina (200mg/L).

6.2.2 Obtención de *E. coli* quimiocompetentes.

Previo a la transformación, las células de *E. coli* se hicieron competentes por medio del uso de CaCl₂. Para esto, 100µL de células criopreservadas, fueron crecidas en 3mL de LB líquido durante 24 horas. Dicho pre-inóculo fue diluido en 100mL de LB y crecido hasta una DO_{600nm} igual a 0,3. Las células fueron centrifugadas a 3.000 x g, durante 10min a 4°C. El sedimento fue resuspendido en 40mL de solución tampón CCMB80 estéril (Acetato de potasio 10mM, CaCl₂ 80 mM, MnCl₂ 20 mM, MgCl₂ 10 mM, glicerol 10%, pH 7,0) y mantenido en hielo durante 40 min. Posteriormente, las células fueron

centrifugadas a 2.000 x g por 8 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y las bacterias se resuspendieron en CCMB80 a una DO_{600nm} igual a 1,5. Finalmente, las células se alicuotaron en volúmenes de 100µL y se guardaron a -80°C.

6.2.3 Transformación de *E. coli* por medio de golpe térmico.

Las alícuotas de *E. coli* quimiocompetentes previamente obtenidas (Sección 6.2.2), fueron descongeladas e incubadas en hielo con 150ng de ADN plasmidial, durante 30min. Luego, las bacterias fueron incubadas a 42°C por 30s e inmediatamente las células fueron traspasadas a hielo y mantenidas en éste durante 2 min. Posteriormente, se agregó 1 mL de LB sin antibiótico y las células fueron incubadas durante 1h a 37°C. Finalmente, se procedió a sembrar las células en LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente para cada vector (sección 6.2.1).

6.3 Trabajo con *Saccharomyces cerevisiae*.

6.3.1 Condiciones de cultivo de *S. cerevisiae*.

Las células de *S. cerevisiae* sin transformar (sección 6.1.3) fueron cultivadas a 28°C con agitación constante en medio YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) o sin agitación en medio YPD sólido (agar 2%). Las cepas *clc1* y *vps41* fueron crecidas en YPD en presencia del antibiótico G418 (200 mg/L).

Por otra parte, las células de *S. cerevisiae* WT y *clc1*, portadoras de algún vector de expresión en levadura (sección 6.8.2), fueron crecidas a 28°C en medio mínimo (YMM) líquido (YNB 0,167%, (NH₄)₂SO₄ 0,502%, glucosa 2%, mix aminoácidos (I)¹ 0,07%, mix aminoácidos (II)² 0,045%) o YMM sólido (agar 2%).

¹ Adenina, arginina, cisteína, leucina, lisina, treonina, triptófano.

² Ácido aspártico, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina, valina.

6.3.2 Obtención de *S. cerevisiae* electrocompetentes.

Se procedió a picar una colonia de *S. cerevisiae*, del genotipo de interés, a partir de un cultivo en medio sólido e inocular 100mL de YPD. Las células fueron crecidas con agitación constante a 28°C, hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 1,3 y 1,5. Luego, se procedió a lavar las levaduras dos veces con un volumen de agua estéril a 4°C, centrifugando a 5000rpm por 6 min cada vez. Posteriormente, el agua fue removida y las células se resuspendieron en 4mL de sorbitol 1M estéril y frío. Las levaduras fueron nuevamente sedimentadas y posteriormente, se resuspendieron en 100μL de sorbitol 1M y se alicuotaron en volúmenes de 40μL para almacenarlas a 4°C, por un tiempo menor a 48 horas antes de su uso.

6.3.3 Transformación de *S. cerevisiae* por medio de electroporación.

A cada alícuota de *S. cerevisiae* (Sección 6.3.2) se le agregó 150ng del vector correspondiente y se mantuvo en hielo por al menos 2min. Posteriormente, las células fueron traspasadas a una cubeta de electroporación de 2mm de grosor y mantenidas en hielo por 2min. Transcurrido ese tiempo, se realizó la electroporación en un equipo BIORAD, entregando un pulso eléctrico de 1,5KV, 25 μF y 200 Ohms. Posteriormente, se agregó 1mL de YPD líquido a las células previamente electroporadas, las que fueron mantenidas con agitación constante durante 1h a 28°C. Luego, las células fueron lavadas dos veces con YMM líquido, centrifugando a 3000xg por 4min cada vez. Finalmente las células fueron sembradas en YMM sólido y crecidas durante 48h.

6.4 Extracción de ácidos nucleicos de microorganismos.

6.4.1 Extracción de ARNm de levaduras nativas (WT).

Con el propósito de clonar la secuencia codificante de ScCLC1, se procedió a extraer ARNm de *S. cerevisiae* WT (Tabla II), para la posterior obtención de ADNc. La extracción se realizó a partir de 10mL de cultivo de levaduras crecidas durante 48h. El medio de cultivo fue descartado y las células se congelaron en nitrógeno líquido. Se agregó 1mL de Tri Reagent y 100 μ L de perlas de vidrio de 0,5mm. Las levaduras fueron agitadas en vórtex a temperatura ambiente durante 8min. Posteriormente se agregaron 200 μ L de cloroformo 100% y se agitó suavemente. El contenido fue centrifugado a 12.000xg durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se le agregó un volumen de fenol ácido:cloroformo 1:1. Luego, se procedió a mezclar y centrifugar, en las mismas condiciones anteriores. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, adicionando 1,5 volúmenes de isopropanol frío y se incubó durante 10min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12.000xg durante 10min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en 50 μ L de agua libre de RNAsas. Se procedió a agregar 500 μ L de etanol 75% y se centrifugó a 8.000 x g durante 5min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue completamente descartado y el precipitado fue disuelto en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

El ARNm fue cuantificado por espectrofotometría y se determinaron los parámetros de calidad de acuerdo a las razones de absorbancia 260nm/280nm y 260nm/230nm.

6.4.2 Extracción de ADNg de levaduras nativas.

Para certificar el genotipo de las cepas de *S. cerevisiae clc1* y *vps41*, se procedió a extraer ADNg a partir de cada una de ellas, con el propósito de analizarlo posteriormente, por medio de PCR. El protocolo utilizado para extraer ADNg desde levaduras, se realizó según lo que describe Harju S. y cols. (2004). Para esto, se centrifugó 1,5mL de cultivo líquido de levaduras crecidas durante 24h, a 14.000 x g por 5min. El medio de cultivo fue descartado y se adicionaron 200µL de solución Harju (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM pH 8,0). Posteriormente, se procedió a congelar la muestra en nitrógeno líquido durante 2min y abruptamente, la temperatura fue cambiada a 95°C, procedimiento que fue repetido dos veces. Luego, las células se agitaron vigorosamente durante 30s. Posteriormente, se agregó 200µL de cloroformo y se procedió a agitar fuertemente por 2min, para luego centrifugar a 14.000 x g por 3min. La fase superior fue transferida a un tubo que contenía 400µL de etanol 100%, previamente enfriado en hielo, y mezclada suavemente por inversión. Luego, la mezcla fue incubada durante 5min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 14.000xg durante 5min. Todo el sobrenadante fue removido y el precipitado fue lavado dos veces con 500µL de etanol 70%, centrifugando a 14000 x g por 5min cada vez. Posteriormente, el etanol fue removido y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente, para finalmente, resuspenderlo en 25µL de agua con RNAsas 10µg/mL.

6.4.3 Extracción de ADN plasmidial desde *E. coli*.

El procedimiento de extracción de ADN plasmidial que fue utilizado para análisis de restricción enzimática y transformación celular, se realizó de acuerdo a lo descrito por Zhou y cols. (1990). Un volumen de 1,5mL de cultivo de 16h de *E. coli* previamente

transformadas, fueron centrifugadas a 10.000 x g durante un minuto. El medio de cultivo fue removido, dejando un volumen de 50µL aproximadamente. Las células fueron resuspendidas y tratadas con 300µL de amortiguador TENS (TRIS 10mM pH7,5, EDTA 1mM pH 8,0, NaOH 0,1mM, SDS 0,5%). Posteriormente, se agregó 150µL de acetato de sodio 3M pH 5,2 y se mezcló vigorosamente. Luego de esto, se procedió a centrifugar durante 2min a 10000xg. El ADNg fue descartado y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se agregaron 900µL de etanol 100% y se centrifugó a 10.000xg durante dos minutos para sedimentar el ADN plasmidial, el cual fue lavado dos veces con etanol 80%, previamente enfriado a -20°C. El etanol fue removido completamente y el ADN plasmidial fue resuspendido en 20µL de agua con RNAsas 10µg/mL.

Las extracciones de los ADN plasmidiales que se emplearon en recombinaciones y secuenciación, fueron realizadas utilizando los Kit comerciales AxyPrep Plasmid Miniprep (Axygen) y Wizard Plus Midipreps (Promega).

6.5 Cuantificación y análisis de ácidos nucleicos.

6.5.1 Cuantificación de ARNm y ADNg

El ARNm y ADNg total extraído a partir de levaduras (Sección 6.4.1 y 6.4.2) fue cuantificado por medio de la absorbancia de cada muestra a 260nm (A_{260}), utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop, ND-1000 UV-Vis). La pureza del ARN o ADN obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 230nm (A_{230}) y 280nm (A_{280}), valores de máxima absorción para sales y proteínas, respectivamente. Aquellas muestras con valores entre 1,8 y 2,0 al calcular el cociente entre A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} , fueron seleccionadas para su uso posterior.

6.5.2 Cuantificación de ADN plasmidial.

El ADN plasmidial extraído a partir de *E. coli* (sección 6.4.3) fue cuantificado y analizado por medio de electroforesis en geles de agarosa 1%, preparados en solución tampón TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH8). Previo a cargar cada muestra en el gel, se procedió a mezclar un volumen de ADN plasmidial con un volumen de solución de carga (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 80%). En paralelo, se cargó un volumen de 6 μ L de marcador de peso molecular de 1Kb de concentración conocida (Gene Ruler, Fermentas). La electroforesis se realizó con una diferencia de potencial constante de 100V durante 45min. Posterior a la electroforesis, cada gel fue incubado en bromuro de etidio 1 μ g/mL durante 20min, visualizado con un transiluminador ultra violeta (GeneGenius Classic, SynGene) y analizado por medio del programa ImageJ, el cual permitió cuantificar la concentración de cada muestra, respecto al marcador de peso molecular utilizado.

6.5.3 Análisis de ADN amplificado por medio de reacciones de PCR.

El ADN amplificado en reacciones de PCR, fue analizado por medio de electroforesis en geles de agarosa 1,5%, preparados en solución tampón TAE (sección 6.5.2). Las muestras fueron mezcladas con solución de carga (sección 6.5.2) en una razón 6:1, previo a ser cargadas en los pocillos del gel. Para la determinación del tamaño de los amplificados de ADN, se cargaron 6 μ L de marcador de peso molecular de 1Kb y/ó 100pb (Gene Ruler, Fermentas), en cada gel de agarosa utilizado. El diferencial de potencial y el tiempo empleado durante las electroforesis, fue de 90V y 1h, respectivamente. Finalmente, cada gel fue analizado de acuerdo a lo descrito en la sección 6.5.2.

6.5.4 Análisis de ADN plasmidial previamente digerido con enzimas de restricción.

El producto de las digestiones enzimáticas de los ADN plasmidiales utilizados en este estudio (Sección 6.7), se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa 2%, en solución tampón TAE (sección 6.5.2). Todo el volumen de cada reacción enzimática fue mezclado con solución de carga (sección 6.5.2), en una razón 4:1 y posteriormente, fue cargado en el gel. Adicionalmente, para la determinación del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos, se cargaron 6µL de marcador de peso molecular de 1Kb y/o 100pb (Gene Ruler, Fermentas). Cada electroforesis se realizó utilizando un diferencial de potencial constante de 80V durante 1,5-2h. Posteriormente, los geles fueron visualizados siguiendo lo descrito en la sección 6.5.2.

6.6 Reacciones de RT-PCR, PCR y secuenciación.

6.6.1 Genotipificación de las cepas *S. cerevisiae clc1* y *vps41*.

Según lo descrito por el proveedor, las cepas *S. cerevisiae clc1* y *vps41* presentan la secuencia KanMX, codificante para la resistencia al antibiótico genético (G418), en reemplazo de la región codificante del gen ScCLC1 y VPS41, respectivamente. Considerando esto, se procedió a analizar la resistencia de estas cepas a G418, creciéndolas en YPD suplementado con este antibiótico (Sección 6.3.1). Adicionalmente, se procedió a corroborar el genotipo de estas cepas, por medio de PCR, utilizando extractos de ADNg de cada una de ellas (sección 6.4.2). Se amplificó por PCR las regiones de interés utilizando la enzima Taq ADN polimerasa en un volumen de 25µL, en una mezcla que contenía: 1µL ADNg (dilución 1/100), partidores 0,5µM, 1U TaqPol, 1X solución tampón con dNTPs. Todos los partidores utilizados se detallan en la Tabla

III. Los programas de PCR, empleados en estas genotipificaciones, se muestran en la Tabla IVA y IVB, dependiendo de los pares de partidores utilizados. Los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa (Sección 6.5.3).

La cepa *clc1* fue genotipificada utilizando los partidores CLC1A y CLC1D, los cuales fueron diseñados para hibridar en las regiones externas que flaquean a KanMX.

Tabla III. Partidores utilizados en las distintas reacciones de PCR de este Seminario de Título, detalladas en la sección 6.6.

Partidor	Secuencia Nucleotídica (5' → 3')	Observaciones
CLC1A	GTTAATCCAGTAAGCGGAACAAGTA	Diseñados para la genotipificación de la cepa <i>S. cerevisiae clc1</i> . Hibridan en los extremos externos al CDS del ORF correspondiente al gen CLC1. Si la cepa es delecional para CLC1, el producto de PCR será de 2197pb. Si la cepa es WT, el producto de PCR será de 1315pb.
CLC1D	TGGATCCAACAAGTAAAATGAAAAT	
VPS41A	GAGGGATTTACTAAAAGATGGGTGT	Diseñados para la genotipificación de la cepa <i>S. cerevisiae vps41</i> . Hibridan en la región externa del CDS del gen VPS41. Si la cepa carece de este gen, el producto de PCR será de 2195pb. Si la cepa es WT, el producto de PCR será de 3590pb.
VPS41D	TTTGTAGTTTTGCCTTAACTCTCG	
KanB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	Diseñado para evaluar la presencia del inserto KanMX en el ADN de las cepas <i>clc1</i> y <i>vps41</i> . Hibrida en una región interna de esta secuencia y en conjunto con los partidores CLC1A o VPS41A, amplifica un producto de PCR de 572 y 631pb, respectivamente.
KanC	TGATTTTGTATGACGAGCGTAAT	Permite evaluar la presencia del inserto KanMX en el ADN de las cepas <i>clc1</i> y <i>vps41</i> . Este partidor hibrida en una región de KanMX y en conjunto con los partidores CLC1D o VPS41D, amplifica un producto de PCR de 967 y 906pb, respectivamente.
AtCLC1F	CATGGCGACTTTTGTATGATGG	Partidores permiten la amplificación de la secuencia codificante del gen AtCLC1, correspondiente a un producto de PCR de 1018pb.
AtCLC1R	TGACTCCGCCTTGGTTC	
AtCLC2F	GATTCGCGAGTTCTTCGTTC	Partidores diseñados para la amplificación de la secuencia codificante del gen AtCLC2, correspondiente a un producto de PCR de 836pb.
AtCLC2R	TGAAGCAGCAGTAACTGCCTC	
ScCLC1F	ATGTCAGAGAAATCCCTCCTTTGGA	Partidores hibridan en los extremos internos de la secuencia codificante del gen ScCLC1, amplificando un fragmento de ADN de 699pb.
ScCLC1R	AGCACCGGGAGCCTTCGCGT	
M13F	GTA AACGACGGCCAG	Partidores utilizados para amplificar y secuenciar el inserto clonado en los vectores pCR8, descritos en este Seminario de Título (Sección 6.8.1)
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	
Poli-T	TTTTTTTTTTTTTTTTT	Partidor utilizado para la transcripción reversa del ARNm de <i>Saccharomyces</i> .

Tabla IV. Programas de PCR utilizados en este Seminario de Título, de acuerdo a lo descrito en la Sección 6.6. Etapas: I) Desnaturalización inicial de ADN; II) Desnaturalización de ADN; III) Hibridación de partidores; IV) Extensión; V) Extensión final.

A. Sección 6.6.1 Genotipificación de las cepas *S. cerevisiae clc1* y *vps41*. Partidores: *CLC1A/CLC1D* y *VPS41A/VPS41D*

Ciclos	Etapas	T (°C)	Tiempo
1	I	94	10min
	II	94	55s
35	III	52	45s
	IV	72	2min
1	V	72	10min

B. Sección 6.6.1 Genotipificación de las cepas *S. cerevisiae clc1* y *vps41*. Partidores: *CLC1A/KanB*, *CLC1D/KanC*, *VPS41A/KanB*, *VPS41D/KanC*.

Ciclos	Etapas	T (°C)	Tiempo
1	I	94	10min
	II	94	55s
35	III	54	45min
	IV	72	1min 30s
1	V	72	10min

C. Sección 6.6.2.3 Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los partidores *ScCLC1F* y *ScCLC1R*.

Ciclos	Etapas	T (°C)	Tiempo
1	I	94	5min
	II	94	30s
35	III	∇ 54-61	45s
	IV	72	50s
1	V	72	10min

D. Sección 6.6.2.3 Amplificación de *ScCLC1* utilizando la enzima *PfuPol* y distintas concentraciones de $MgSO_4$.

Ciclos	Etapas	T (°C)	Tiempo
1	I	94	10min
	II	94	30s
30	III	61	1min
	IV	72	2min
1	V	72	10min

E. Sección 6.6.3 Reacciones de PCR de colonias de *E. coli*. Partidores: *AtCLC1F/AtCLC1R* y *AtCLC2F/AtCLC2R*.

Ciclos	Etapas	T (°C)	Tiempo
1	I	94	5min
	II	94	30s
35	III	56	40s
	IV	72	1min 30s
1	V	72	10min

F. Sección 6.6.3 Reacciones de PCR de colonias de *E. coli*. Partidores: *ScCLC1F/ScCLC1R*.

Ciclos	Etapas	T (°C)	Tiempo
1	I	94	5min
	II	94	30s
35	III	61	40s
	IV	72	1min
1	V	72	10min

Adicionalmente, se realizaron dos reacciones de PCR con los pares de partidores *CLC1A/ KanB* y *CLC1D / KanC*, los cuales permiten la amplificación de las regiones 5' y 3' de *KanMX* respectivamente, siempre y cuando dicha secuencia se encuentre interrumpiendo el locus correspondiente a *ScCLC1*.

Por otra parte, el genotipo de la cepa *vps41* fue determinado por PCR utilizando los partidores *VPS41A* y *VPS41D*, los cuales permiten amplificar la región del locus de *VPS41*, que contiene a *KanMX*. Por otra parte, los extremos 5' y 3' de esta inserción, fueron analizados utilizando los pares de partidores *VPS41A/KanB* y *VPS41D/KanC*.

6.6.2 Aislamiento de las secuencias de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1.

6.6.2.1 Obtención de ADNc a partir de ARNm de *S. cerevisiae*.

Las muestras de ARNm obtenidas a partir de *S. cerevisiae* (sección 6.4.1), fueron tratadas con DNAsa para la eliminación de ADNg. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10µl en agua DEPC, cuya composición final fue: 1µg de ARN, 1U DNAsa I (Fermentas), 1X tampón DNAsa I (suplementado con MgCl₂), 1U de inhibidor de RNAsa RiboLock (Fermentas). La reacción fue incubada a 37°C durante 30min y posteriormente, se adicionó EDTA 2,5mM manteniéndose en hielo durante 5min. Acto seguido, se procedió a obtener ADNc a partir del ARNm previamente tratado con DNAsa. Para esto, se incubaron 6,5µL de ARNm con partidor Poli-T 1,5µM a 70°C por 5min. Posteriormente, los tubos fueron incubados en hielo por 5min, momento en el que se adicionó 1µL de Transcriptasa Reversa (Promega), 1X tampón ImProm-II[®](Promega), MgCl₂ 10 mM, dNTPs 0,8 mM, 1U de inhibidor de RNAsa RiboLock. Luego, la temperatura fue cambiada a 25°C durante 5min y posteriormente, la mezcla se mantuvo a 42°C por 1h. Finalmente, la reacción fue incubada a 70°C durante 15min, para posteriormente ser almacenada a -20°C.

6.6.2.2 Diseño de partidores específicos para amplificar AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1.

Con el objetivo de clonar AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 a partir de ADNc, se procedió a diseñar partidores específicos para la amplificación de estas secuencias. Para esto se consideró la eliminación del codón de término de la traducción, en los partidores que hibridan en el extremo 3' de la hebra codificante de cada secuencia (AtCLC1R, AtCLC2R, ScCLC1R).

El diseño de los partidores para la amplificación de las secuencias de AtCLC1 y AtCLC2, fue realizado en un trabajo previo a este Seminario de Título por la estudiante de doctorado Pamela Urrutia. Dichos partidores fueron diseñados a partir de la secuencia codificante de AtCLC1 y AtCLC2 publicada en la base de datos de Arabidopsis (www.arabidopsis.org), con los números de acceso At2g20760 y At2g40060, respectivamente. Los partidores AtCLC1F y AtCLC1R, fueron diseñados para amplificar la secuencia de AtCLC1 de 1018pb. En tanto, los partidores AtCLC2F y AtCLC2R amplifican un fragmento de ADN de 829pb, correspondientes a AtCLC2. Ambos pares de partidores se detallan en la Tabla III.

Para la clonación de ScCLC1, los partidores fueron diseñados a partir de la secuencia con número de acceso YGR167W, disponible en la base de datos de Saccharomyces (www.yeastgenome.org). Los partidores ScCLC1F y ScCLC1R, detallados en la Tabla III, amplifican un ADN de 699pb, correspondientes a la secuencia codificante de ScCLC1.

6.6.2.3 Estandarización de la reacción de PCR para la amplificación de ScCLC1.

A partir de ADNc de *S. cerevesiciae* (6.6.2.1), se procedió a amplificar por PCR la secuencia de ScCLC1 utilizando los partidores previamente descritos (6.6.2.2, Tabla III). Cada reacción de PCR se llevó a cabo con la enzima Taq ADN Polimerasa (TaqPol, Sigma), utilizando 1U TaqPol, dNTPs 0,5mM, partidores 0,5 μ M, 1 μ L ADNc molde y 1X solución tampón TaqPol (Sigma) en agua nanopura en un volumen final de 20 μ L. El programa de PCR utilizado se describe en la Tabla IV.C, en el cual se ensayaron distintas temperaturas de hibridación de partidores, entre 54°C y 61°C. Los productos de cada PCR fueron analizados de acuerdo a lo descrito en la sección 6.5.3.

Posteriormente, se procedió a amplificar la secuencia de ScCLC1 a partir de ADNc de *S. cerevisiae* (sección 6.6.2.1), utilizando la enzima Pfu ADN Polimerasa (PfuPol, Fermentas), la cual tiene actividad exonucleasa 3'→5', por lo que la tasa de error de amplificación es 10 veces menor a la de la enzima TaqPol. Distintas concentraciones de MgSO₄ fueron ensayadas, para determinar las condiciones óptimas de PCR. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL y contenía: MgSO₄ (3,5mM, 4mM ó 4,5mM), 1U PfuPol, dNTPs 0,5mM, partidores 0,5µM, 1µL ADNc molde y 1X solución tampón PfuPol (Fermentas). El programa de PCR utilizado en esta reacción, se detalla en la Tabla IV.D. Los productos de cada reacción fueron analizados por medio de electroforesis, según lo señalado en la sección 6.5.3.

6.6.2.4 Purificación de productos de PCR, desde geles de agarosa.

El aislamiento de los productos de PCR (PfuPol, sección 6.6.2.3), se realizó por medio de una electroforesis (sección 6.5.3) seguida de una purificación de ADN desde el gel de agarosa respectivo. Para esto se empleó el kit de purificación de ADN Wizard SV Gel & PCR Clean Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor.

6.6.3 Reacciones de PCR de colonias de *E.coli*.

La presencia de las secuencias de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1, fue analizada por medio de PCR de colonia, en los distintos clones de *E. coli* obtenidos de las transformaciones descritas en la sección 6.7. Aquellas colonias resistentes al antibiótico de selección, fueron resuspendidas en 10µL de agua nanopura. Posteriormente, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25µL en una mezcla que incluía: 1µL dilución de bacterias, 1U TaqPol (Sigma), dNTPs 0,5mM, partidores 0,5µM, 1X solución tampón TaqPol (Sigma). Los pares de partidores empleados en estas reacciones fueron: AtCLC1F/AtCLC1R, AtCLC2F/AtCLC2R y ScCLC1F/ScCLC1R, dependiendo de la

secuencia que se quisiera analizar (Tabla III). Los programas de PCR utilizados se detallan en la Tabla IV.E y F.

6.6.4 Secuenciación de vectores pCR8.

Los vectores pCR8 descritos en la sección 6.7.1 fueron secuenciados en Macrogen USA Corp. utilizando los partidores M13F y M13R, los cuales flanquean al inserto en el vector y cuya secuencia se detalla en la Tabla III.

6.7 Digestiones enzimáticas de ADN plasmidial.

6.7.1 Digestión enzimática del vector pCR8-ScCLC1.

Los vectores pCR8-ScCLC1, purificados a partir de los clones de *E. coli* resistentes a espectinomicina (6.8.1), fueron analizados por medio de digestión enzimática, para determinar la direccionalidad con que ScCLC1 fue insertado en el vector pCR8. Con esta finalidad, se realizó una digestión doble con las endonucleasas *HindIII* y *XbaI*. La primera de ellas corta al vector en el nucleótido 1328 dentro de la región codificante para ScCLC1. La segunda, corta al vector en el nucleótido 1623, en la región río abajo de la inserción de ScCLC1. La digestión doble se llevó a cabo en un volumen de 20 μ L, utilizando 200ng de vector purificado, 1U *XbaI*, 2U *HindIII*, 1X solución tampón Tango (Fermentas). En paralelo, se procedió a digerir el vector con cada una de las enzimas anteriormente señaladas. Para esto se mezcló 50ng de vector con 1U *XbaI* en 1X solución tampón Tango (Fermentas) y 50ng de vector con 1U *HindIII* en 1X solución tampón "R" (Fermentas), ambas reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 20 μ L. Las mezclas fueron incubadas durante 12h a 37°C y posteriormente analizadas por medio de electroforesis (Sección 6.5.4).

6.7.2 Digestión enzimática de los vectores de expresión constitutiva en levadura.

La dirección de la inserción de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1, en los vectores de expresión en levadura (sección 6.8.2), fue analizada por medio de digestión enzimática. Las reacciones que se describen a continuación fueron realizadas en un volumen final de 20 μ L. Las mezclas se incubaron durante 12h a 37°C y posteriormente, el ADN digerido fue analizado por medio de electroforesis (Sección 6.5.4).

Los vectores pScCLC1-HA y pScCLC1-EGFP, fueron digeridos con la enzima *HindIII*, la cual corta a ambos vectores en una región interna a la secuencia de ScCLC1 (nucleótido 5005) y en un sitio río abajo del inserto, correspondiente al nucleótido 5121. Ambas reacciones fueron llevadas a cabo utilizando 700ng de vector, 1 U *HindIII* en solución tampón "R" (Fermentas).

Los plásmidos pAtCLC1-HA y pAtCLC1-EGFP, fueron digeridos con la enzima *PstI*, la cual corta a cada vector dentro de la secuencia AtCLC1 (nucleótido 5221) y en el nucleótido 5411, correspondiente a la región río abajo del inserto. Existe además, un tercer punto de corte de *PstI*, el cual se localiza en el nucleótido 7414 en pAtCLC1-HA y en el nucleótido 8023 para el vector pAtCLC1-EGFP. Cada una de estas reacciones, se llevó a cabo utilizando 700ng de vector, 1 U *PstI*, 1X solución tampón "O" (Fermentas). Adicionalmente, se linearizó cada vector utilizando la enzima *HindIII*, la cual corta en el nucleótido 5424. Estas reacciones se llevaron a cabo utilizando 50ng de vector, 1 U *HindIII*, 1X solución tampón "R" (Fermentas).

Por otra parte, el análisis de los vectores pAtCLC2-HA y pAtCLC2-EGFP, se llevó a cabo utilizando la enzima *BamHI*. Esta endonucleasa digiere en dos puntos a ambos plásmidos: en el nucleótido 4294, localizado río arriba del inserto y en el nucleótido 4595, ubicado en el interior de la secuencia de AtCLC2. Cada reacción se realizó

utilizando 400ng de vector, 1 U *BamHI* y 1X solución tampón “*BamHI*” (Fermentas). Paralelamente, cada vector fue linearizado utilizando la enzima *NcoI*, la cual corta sólo en un punto, correspondiente al nucleótido 6994 en pAtCLC2-HA y al nucleótido 7603 en pAtCLC2-EGFP. Estas reacciones fueron realizadas empleando 50ng de vector, 1 U *NcoI* y 1X solución tampón Tango (Fermentas).

6.8 Diseño y construcción de vectores.

6.8.1 Clonación de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en el vector pCR8/GW/TOPO

El plásmido pCR8/GW/TOPO (pCR8, Invitrogen) fue seleccionado para clonar las secuencias de ADN de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1, vectores que posteriormente fueron denominados como pCR8-AtCLC1, pCR8-AtCLC2 y pCR8-ScCLC1, respectivamente. pCR8 fue elegido como vector de entrada, debido a que permite la integración eficiente de un fragmento de ADN en su secuencia, empleando una enzima topoisomerasa. Adicionalmente, la región del vector donde ocurre esta inserción, está flanqueada por secuencias AttL, las cuales permiten una óptima transferencia del inserto a un vector de destinación, que presente dos regiones AttR. Esto ocurre gracias a la mezcla de enzimas LR clonasa, la cual media la recombinación de las secuencias AttL y AttR, posicionando al inserto en la dirección deseada, de acuerdo al vector de destinación seleccionado.

El correcto clonamiento de las secuencias de AtCLC1 y AtCLC2 en pCR8, fue llevado a cabo por Pamela Urrutia, previo al desarrollo de esta investigación. Por otra parte, ScCLC1 fue clonado durante el desarrollo de este Seminario de Título y su inserción en el vector pCR8, involucró el aislamiento del producto de PCR obtenido con la enzima PfuPol (sección 6.6.4), desde un gel de agarosa. Posteriormente, se adicionó un nucleótido de adenina en el extremo 3' de cada hebra de ADN. Para esto se procedió a mezclar, en un volumen final de 10µL: 150ng de ADN purificado, 0,2mM dATPs, 5U

TaqPol y 1X solución tampón TaqPol (Sigma), e incubada durante 30min a 70°C. Posteriormente, se tomaron 2µL de la solución anteriormente señalada y se adicionaron 0,5µL de vector pCR8 y 0,5µL de solución salina (Invitrogen). La mezcla fue incubada a 25°C durante 1h, con la cual se procedió a transformar células *E. coli* DH5α quimiocompetentes (sección 6.2.2 y 6.2.3) y sembrarlas en medio LB sólido con espectinomicina (sección 6.2.1). La presencia de la secuencia de ScCLC1 en las colonias resistentes a espectinomicina, fue analizada por medio de PCR de colonia (Sección 6.6.3). A aquellas colonias positivas para ScCLC1, se les procedió a extraer ADN plasmidial (Sección 6.4.3), el cual fue analizado por medio de digestión enzimática (Sección 6.7.1) y secuenciación (sección 6.6.4).

6.8.2 Construcción de vectores de expresión constitutiva de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en levadura.

Los vectores pAG426GPD-ccdB-HA (pGPD-si-HA) y pAG426GPD-ccdB-EGFP (pGPD-si-EGFP), fueron seleccionados para expresar constitutivamente AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en levaduras. Ambos vectores presentan secuencias attR, las cuales permiten la inserción direccionada de un fragmento de ADN, desde un vector de entrada que presente los sitios attL en los bordes del inserto. De esta forma, utilizando la mezcla de enzimas LR clonasa, es posible transferir las secuencias AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 desde los vectores pCR8 (Sección 6.8.1) al plásmido pGPD-si-HA, obteniéndose los vectores pAtCLC1-HA, pAtCLC2-HA y pScCLC1-HA, respectivamente. Utilizando la misma estrategia, es posible transferir las secuencias previamente descritas, desde los vectores pCR8 al plásmido pGPD-si-EGFP, obteniéndose los vectores pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP y pScCLC1-EGFP. La inserción direccionada de estas secuencias, permite que su expresión sea dirigida por el promotor del gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPD), el cual se expresa constitutivamente en levaduras.

Adicionalmente, los vectores pGPD-si-HA y pGPD-si-EGFP, portadores de un inserto (AtCLC1, AtCLC2 o ScCLC1), permiten fusionar en el extremo carboxilo de la proteína traducida, la secuencia del péptido HA (Hemaglutinina de la influenza humana, en el vector pGPD-si-HA) y EGFP (Proteína fluorescente verde, en el vector pGPD-si-EGFP), respectivamente. Ambas fusiones pueden ser reconocidas por medio de técnicas de inmunoblot, ya que existen anticuerpos monoclonales comerciales. Por otra parte, la fusión de las proteínas AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 a EGFP, permite analizar su localización subcelular, por medio de microscopía confocal.

La recombinación de cada vector pCR8 (6.8.1) con el vector pGPD-si-HA o pGPD-si-EGFP se llevó a cabo mezclando 150ng de cada vector con 1X LR clonasa (Invitrogen), en un volumen final de 8 μ L. La mezcla se incubó durante 3h a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 2 μ g de proteinasa K y se dejó incubar a 37°C durante 20min. Finalmente, se procedió a transformar células de *E. coli* DH5 α (6.2.3) y a seleccionar en medio con ampicilina, aquellas colonias portadoras de cada vector (Sección 6.2.1).

6.9 Análisis de expresión de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 fusionadas a HA y EGFP, en *S. cerevisiae*.

6.9.1 Extracción de proteínas totales desde *S. cerevisiae*.

Previo al análisis de la expresión de las proteínas de fusión a HA o EGFP (sección 6.9.2), se procedió a extraer las proteínas totales de las levaduras transformadas con los vectores descritos en la sección 6.8.2. El protocolo de extracción de proteínas utilizado en este Seminario de Título, se basó en lo descrito por Laemmli U. (1970). Un volumen de 10mL de cultivo de levaduras crecidas durante 48h, fue sedimentado a 14000xg por 2min. El medio de cultivo se descartó completamente y el sedimentado se resuspendió en 100 μ L

de solución tampón Laemmli (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,004%, Tris-HCl 0,125M), agitando vigorosamente. Posteriormente, la mezcla fue incubada a 100°C durante 10min y centrifugada a 14000xg por 2min. El sobrenadante fue almacenado a -20°C para su uso posterior.

6.9.2 Detección de proteínas de fusión a HA o EGFP por medio de Western Blot.

Se realizó un SDS-PAGE con los extractos de proteínas descritos en la sección 6.9.1. Para aquellos extractos provenientes de levaduras transformadas con los vectores pAtCLC1-HA, pAtCLC2-HA, pScCLC1-HA y pGPD-si-HA se empleó un gel de poliacrilamida 14% (Tris-HCL 375mM pH8.8, acrilamida-bis-acrilamida 14%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,06%). En tanto, para los extractos procedentes de las levaduras transformadas con los vectores pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP, pScCLC1-EGFP y pGPD-si-EGFP, se utilizó un gel resolvidor poliacrilamida 10% (Tris-HCL 375mM pH8.8, acrilamida-bis-acrilamida 10%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,06%). El gel concentrador utilizado en ambas electroforesis fue de poliacrilamida 4% (Tris-HCL 125mM pH6.8, acrilamida-bis-acrilamida 4%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,06%). En cada gel señalado anteriormente, se cargaron 10µL de cada muestra a partir del extracto total de proteínas previamente obtenido (sección 6.9.1) y 3µL de marcador de peso molecular (Fermentas). Cada electroforesis fue realizada en solución tampón de corrida (Tris base 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%), empleando un diferencial de potencial constante de 80V durante 1h, seguido de 100V por 2h.

Las proteínas fueron traspasadas a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific), en solución de transferencia (Tris base 25mM, glicina 192mM, metanol 20%), utilizando

un voltaje constante de 15V por 20min (para geles poliacrilamida 14%) ó 13min (para geles poliacrilamida 10%). Para analizar la calidad de la electroforesis y la transferencia, las membranas fueron teñidas con Rojo de Ponceau 0,1% (Sigma) durante 5min, el cual fue posteriormente removido, lavando con TBS-T (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) por 10min. A continuación, las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo (leche 5%, en TBS-T) a 4°C durante 12h. Luego de tres lavados en TBS-T de 10min cada uno, las membranas fueron incubadas con anticuerpo primario, diluidos en TBS-T 1% leche: anti-HA 1:5000 (Invitrogen) ó anti-GFP 1:5000 (ROCHE), durante 2h a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T, durante 10min cada vez y posteriormente, fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-mouse-IgG-peroxidasa 1:5000 (Invitrogen), diluido en TBS-T con leche 1%, a temperatura ambiente durante 2h. Luego, las membranas fueron lavadas tres veces, de acuerdo a lo descrito anteriormente y reveladas en oscuridad, utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) y placas fotográficas (Kodak).

6.10 Análisis de la localización subcelular de las proteínas de fusión AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP en *S. cerevisiae*.

Las levaduras que expresaban las proteínas de fusión AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP, fueron observadas por medio de microscopía confocal, para la determinación de su localización subcelular. Se procedió a crecer una colonia fresca de cada cepa de levaduras en 1mL de YMM líquido durante 24h. Posteriormente, las células fueron sedimentadas a 5.000 x g por 1min, el medio de cultivo fue descartado y las células se resuspendieron en 500µL de YPD líquido. Con el objetivo de delimitar las membranas vacuolares, las células fueron tratadas con FM4-64 20µM (Invitrogen) y se

mantuvieron a 28°C durante 30min. Este compuesto se une a la membrana plasmática de las células y posteriormente se internaliza por medio de la ruta endocítica, llegando a formar parte de la membrana vacuolar, de acuerdo a lo que se ilustra en el esquema de la Figura 4. Finalmente, 3µL de cada cultivo de levaduras fue montado en un portaobjeto y observado por medio de microscopía confocal (Zeiss LSM 510). Las muestras fueron excitadas con un láser de 514nm de longitud de onda para FM4-64 y 488nm para EGFP. La luz emitida por FM4-64 fue capturada con un filtro que permite el paso de longitudes de onda mayores a los 560nm. En tanto, la emisión de EGFP fue capturada con un filtro de 505-530nm. El experimento fue realizado dos veces para cada cepa de levaduras, observando 50 células en cada uno de ellos.

6.11 Análisis de complementación heteróloga de AtClc1 en *S. cerevisiae clc1*.

En este Seminario de Título se procedió a analizar la capacidad de AtCLC1 de revertir la endocitosis enlentecida, el fenotipo multivacuolar y la menor tasa de crecimiento, presentes en la cepa *S. cerevisiae clc1*. Considerando dicho objetivo, se evaluaron tales fenotipos en las levaduras *clc1*-AtCLC1-HA, *clc1*-ScCLC1-HA, *clc1*-AtCLC2-HA, *clc1*-si-HA y WT-si-HA, según lo descrito a continuación.

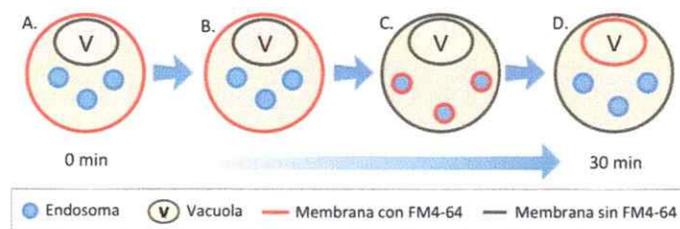


Figura 4. Representación gráfica del proceso de internalización de FM4-64 en una célula de *Saccharomyces*. Posterior a la incubación con FM4-64, la tinción se intercala en la membrana plasmática permitiendo marcar el límite celular (A, Tiempo 0min). En condiciones fisiológicas, la membrana plasmática, previamente marcada con FM4-64, se internaliza por medio de vesículas (B) llegando a formar parte de compartimentos endosomales (C). Estos endosomas continúan la ruta endocítica, los que finalmente se fusionan con las vacuolas de la célula (D).

6.11.1 Ensayo de internalización de FM4-64 en *S. cerevisiae*.

Una colonia de cada una de las cepas evaluadas en este ensayo (Sección 6.11), fue crecida en 500 μ L de YMM a 28°C durante 24h con agitación constante. Las células se centrifugaron a 5000xg por 1min y el medio de cultivo fue removido. Posteriormente, las levaduras fueron resuspendidas en 250 μ L de YPD, previamente enfriado en hielo. A un volumen de 50 μ L de este cultivo se le adicionó FM4-64 (20 μ M) y se incubó a 4°C durante 30min. Posteriormente, las células fueron sedimentadas por medio de una centrifugación de corta duración (1-2s). La tinción fue removida y el medio de cultivo fue reemplazado por 50 μ L de YPD fresco, previamente enfriado en hielo. Luego, la temperatura fue cambiada a 28°C y una alícuota de 5 μ L de células fue observada por medio de microscopía confocal (tiempo 0) y después de 4, 8 y 12min. Cada muestra analizada fue montada sobre un portaobjeto previamente tratado con 5 μ L de concanavalina A (1mg/ml). Empleando un microscopio confocal Zeiss LSM 510, las muestras fueron incididas por un láser de longitud de onda de 543nm y observadas utilizando un filtro de emisión mayor a los 560nm. Veinte células fueron observadas en cada tiempo analizado. El ensayo fue repetido tres veces para cada cepa de levaduras.

6.11.2 Análisis de fenotipo vacuolar en *S. cerevisiae*.

El análisis del fenotipo vacuolar de las levaduras *clc1* (Sección 6.11), fue realizado de acuerdo a lo descrito por Seeley E. y cols. (2002). Se procedió a crecer una colonia de levaduras en 500 μ L de YMM suplementado con FM4-64 (3 μ M), durante 20-24h a 28°C con agitación constante y en oscuridad. En paralelo y como una forma de controlar que no existiesen aumentos de temperatura durante el desarrollo del experimento, este ensayo también se realizó utilizando la cepa *vps41*, la cual fue crecida bajo las mismas condiciones detalladas previamente. Posteriormente, 3 μ L de cada cultivo fueron

montados sobre un portaobjetos y analizados utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510, de acuerdo a lo descrito en la sección 6.11.1. Las características vacuolares de 110-150 células fueron analizadas y clasificadas según su fenotipo en “A”, “B” o “C”, de acuerdo a lo propuesto por Seeley E. y cols. (2002). El ensayo fue repetido dos veces de manera independiente para cada cepa de levaduras.

6.11.3 Análisis de la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*.

La cinética de crecimiento de las cepas de levaduras evaluadas en este ensayo (Sección 6.11), se realizó a partir de un pre-inóculo crecido previamente en YMM líquido durante 24h a 28°C. La densidad óptica de tal pre-inóculo fue medida a 600nm y diluida hasta alcanzar un valor de 0,2. En una placa de 96 pocillos, se procedió a cargar un volumen de 200µL de cada dilución de cultivo, considerando tres réplicas técnicas por cada cepa de levaduras. La placa fue cubierta con una membrana transparente que permite el intercambio de gases, para preservar las condiciones de esterilidad. La densidad óptica de cada pocillo fue medida a 620nm cada una hora, durante 13h, utilizando el espectrofotómetro Infinite F50, TECAN. El experimento fue repetido tres veces para cada una de las cepas de *S. cerevisiae*.

7. RESULTADOS

7.1 Clonación de las secuencias de ADN codificantes para las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1, en un vector bacteriano.

Con el objetivo de estudiar funcionalmente la proteína AtClc1, su secuencia codificante fue clonada en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (pCR8). Este vector facilitó la posterior transferencia de esta secuencia a un vector de destinación que permitió, finalmente, su expresión constitutiva en *S. cerevisiae* (Sección 6.8).

Dado que el estudio que se aborda en este Seminario de Título, pretende esclarecer si AtClc1 presenta una función celular similar al de otras Clc, fue necesario el desarrollo de un apropiado modelo comparativo, que permitiese responder esta pregunta. Considerando lo anterior, los ADNc de AtCLC2 y ScCLC1, dos Clc ya descritas, también fueron clonados en pCR8 y posteriormente, fueron transferidos a un vector de destinación que permitió su expresión constitutiva en *S. cerevisiae* (Sección 6.8). Así, estas cepas de levaduras fueron empleadas, posteriormente, como control y parámetro de comparación, para el estudio funcional de AtCLC1.

7.1.1. Clonación de los ADNc de AtCLC1 y AtCLC2 en el vector pCR8/GW/TOPO

Las secuencias codificantes para las proteínas AtClc1 y AtClc2 fueron amplificadas a partir de ADNc de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y clonadas en el vector de entrada pCR8, previo al desarrollo de este Seminario de Título, por la Srta. Pamela Urrutia. Los vectores obtenidos fueron secuenciados utilizando los partidores M13F y M13R,

los cuales permiten amplificar la región donde se ubica el ADN inserto. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las descritas en la base de datos de *Arabidopsis*, tanto para el ADNc de AtCLC1 (At2g20760), así como para AtCLC2 (At2g40060). Los resultados de dicho alineamiento, mostraron un 100% de identidad nucleotídica para ambas secuencias. Además se confirmó que el codón de término fue reemplazado por la secuencia UCA, codificante para el residuo serina e importante para una posterior fusión exitosa de cada proteína al epítipo HA y la proteína EGFP en su región C-terminal (Sección 6.8.2). Los vectores obtenidos y utilizados en esta investigación fueron denominados pCR8-AtCLC1 y pCR8-AtCLC2.

7.1.2. Clonación del ADNc de ScCLC1 en el vector pCR8/GW/TOPO.

Las condiciones de amplificación del ADNc de ScCLC1, fueron estandarizadas utilizando los partidores ScCLC1F y ScCLC1R (Tabla III.). Para esto, se realizaron distintas reacciones de PCR, utilizando la enzima Taq ADN Polimerasa y diferentes temperaturas de hibridación de partidores (T°HP). Posteriormente, se determinó la

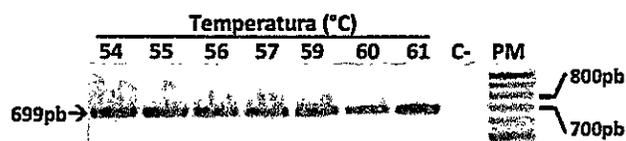


Figura 5. Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los partidores ScCLC1F y ScCLC1R. La secuencia de ScCLC1 (699pb) fue amplificada a partir de ADNc de *S. cerevisiae* WT, por medio de PCR utilizando la enzima *Taq* ADN Polimerasa y distintas temperaturas de hibridación de los partidores (T°HP) ScCLC1F y ScCLC1R (Sección 6.6.2.3). En la figura se muestra la electroforesis de los productos de PCR de cada una de las reacciones de PCR. Sobre cada carril, se describe la T°HP utilizada en dicha reacción de PCR. En la figura se observa que el uso de T°HP entre los 54°C y 61°C, genera un amplificado único, cuyo tamaño se corresponde con lo teóricamente esperado (699pb). C- corresponde al control negativo de partidores, donde no se agregó templado en la reacción. PM, marcador de peso molecular.

realizadas empleando la enzima PfuPol y diferentes concentraciones de MgSO₄ (Sección 6.6.2.3). Los productos de PCR fueron analizados por medio de una electroforesis, la cual se ilustra en la Figura 6, donde se observa que en las tres condiciones empleadas, se obtuvo un único amplificado cuyo tamaño aproximado fue congruente al teóricamente esperado (699pb). Sin embargo, a una concentración de 3,5mM de MgSO₄ la banda obtenida fue más intensa, lo que refleja una mayor eficiencia de la reacción de PCR. Debido a esto, la concentración de MgSO₄ utilizada en la amplificación de ScCLC1 con la enzima PfuPol, fue de 3,5mM.

Una vez estandarizada la reacción de PCR de ScCLC1, se procedió a clonar esta

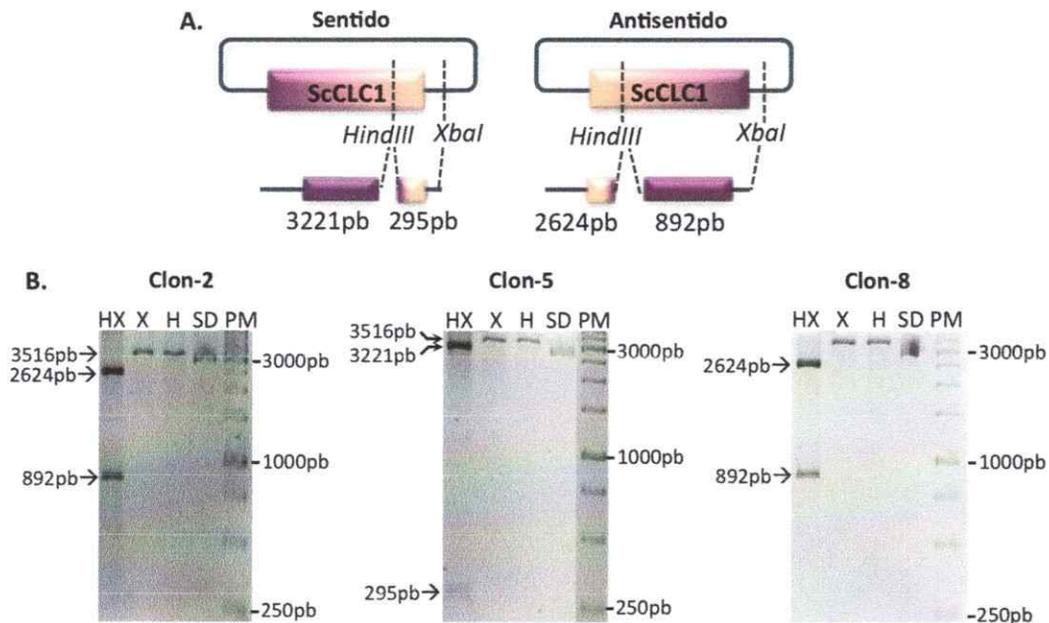


Figura 7. Determinación de la orientación de inserción de ScCLC1 en el vector pCR8-ScCLC1. **A.** Tamaño esperado de los fragmentos de ADN obtenidos luego de la digestión *in silico* del vector pCR8-ScCLC1, con las enzimas *XbaI* y *HindIII*, dependiendo de la orientación del inserto (sentido o antisentido) respecto al marco de clonamiento del vector. **B.** Electroforesis en gel de agarosa, del producto de la digestión de los vectores pCR8-ScCLC1, provenientes de los clones 2, 5 y 8. Las enzimas utilizadas en cada digestión se detallan sobre cada carril del gel: HX, *HindIII* + *XbaI*; X, *XbaI*; H, *HindIII*; SD, vector sin digerir; PM, marcador de peso molecular. En la figura se observa que la digestión con *HindIII* + *XbaI* del vector proveniente del clon 5, genera fragmentos de ADN de tamaño 3221pb y 295pb, congruente con una orientación del inserto en sentido respecto al marco de clonamiento.

secuencia en el vector pCR8 y transformar células *E. coli* DH5 α . Las colonias transformantes fueron seleccionadas en espectinomicina (Sección 6.8.1). Del total de colonias que fueron resistentes al antibiótico, diez de ellas fueron analizadas por medio de la amplificación por PCR de colonia de ScCLC1 (dato no mostrado). A partir de dicho ensayo, se seleccionaron tres colonias que fueron positivas para la presencia de ScCLC1, a las cuales se les extrajo su ADN plasmidial.

La orientación del inserto en dichos plásmidos, fue evaluada por medio de un ensayo de digestión doble, con las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*. Como se puede observar en la electroforesis de la Figura 7.B, al digerir los plásmidos de los clones 2 y 8, con las enzimas *XbaI* y *HindIII*, se obtienen dos bandas de tamaño aproximado al teóricamente esperado (892pb y 2624pb), para una orientación antisentido del inserto, respecto al marco de clonamiento. En tanto, al digerir el plásmido del clon 5, con las enzimas *XbaI* y *HindIII* (Figura 7.B, Clon-5), se observa que las bandas obtenidas tienen un tamaño aproximado congruente con lo esperado para una orientación del inserto ScCLC1, en sentido respecto al marco de clonamiento del vector pCR8 (bandas de 295pb y 3221pb). Al digerir de manera independiente, cada uno de estos plásmidos, con las enzimas *XbaI* y *HindIII*, se obtuvo una banda única cuyo tamaño aproximado fue correspondiente al del vector linearizado (3516pb). Cabe señalar que al realizar una electroforesis de cada vector sin digerir, se observó una banda de 3000pb aproximadamente. Si bien esto es menor al tamaño teórico del plásmido (3516pb), es esperable considerando el estado de sobre-enrollamiento que presenta el ADN circular.

Dado que la orientación del inserto ScCLC1 en pCR8, es importante para el éxito de la estrategia de clonación en los vectores de expresión en levaduras (Sección 6.8.2), el plásmido correspondiente al clon 5, fue analizado por medio de secuenciación, utilizando los partidores M13F y M13R. La secuencia obtenida fue alineada con la descrita en la base de datos de *Saccharomyces* (YGR167W), revelando un 100% de identidad nucleotídica. Además se corroboró el cambio del codón de término por la secuencia AAG, codificante para el residuo lisina. Esta observación es fundamental para el correcto clonamiento de ScCLC1, en los vectores de destinación que se detallan a continuación (Sección 7.2). Así, el vector obtenido a partir del clon 5, fue denominado pCR8-ScCLC1 y fue seleccionado para su uso en los ensayos posteriores.

7.2 Obtención de vectores de expresión constitutiva de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en *S. cerevisiae*.

El objetivo de obtener vectores que permitan la expresión constitutiva de AtClc1 en *S. cerevisiae*, es evaluar su participación en procesos celulares relacionados con clatrina en un sistema heterólogo. En tanto, como se mencionó en la sección 7.1, la expresión constitutiva de AtClc2 y ScClc1, permitirá comparar el comportamiento de AtClc1, con dos Clc ya descritas en la literatura.

Los vectores seleccionados para expresar estas secuencias en *S. cerevisiae* pertenecen a la familia pAG426-GPD (pGPD). Estos presentan en la región río arriba del sitio de recombinación, el promotor del gen codificante para la proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) de *Saccharomyces*. Dicho promotor se expresa

constitutivamente en levaduras, permitiendo abordar los Objetivos Específicos 3 y 4 de este Seminario de Título (Sección 5.2)

Particularmente, para responder al Objetivo Específico N° 3, se seleccionó como vector de destinación al plásmido pAG426GPD-ccdB-EGFP (pGPD-si-EGFP). Este vector permite fusionar río abajo del inserto, la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde (EGFP). De esta forma el promotor GPD, ubicado río arriba de este constructo, permite la expresión de una secuencia codificante para una proteína de fusión a EGFP, en su extremo C-terminal. Así, al insertar las secuencias de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 en vectores pGPD-si-EGFP independientes, las proteínas generadas producto de la expresión de cada vector, tendrán su extremo C-terminal fusionado a EGFP. Esto permite determinar, por medio de microscopía confocal, la disposición intracelular de las tres Clc estudiadas en este Seminario de Título.

Por otra parte, para abordar el Objetivo Específico N°4, fue necesario expresar las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 fusionadas a un péptido que permitiera analizar su expresión por medio del uso de anticuerpos, con una baja probabilidad de interferir con la función de la proteína. Considerando esto, el epítipo HA fue elegido para ser fusionado en el extremo C-terminal de cada Clc previamente descrita. Así, las secuencias de AtCLC1, AtCLC2 y ScCLC1 fueron insertadas de forma independiente en el vector pAG426GPD-ccdB-HA (pGPD-si-HA).

Considerando lo anterior, los vectores pCR8-AtCLC1, pCR8-AtCLC2 y pCR8-ScCLC1 fueron recombinados, con los vectores pGPD-si-EGFP y pGPD-si-HA,

utilizando la mezcla de enzimas LR clonasa, de acuerdo a lo descrito en la sección 6.8.2. Posteriormente, células de *E. coli* DH5 α fueron transformadas y seleccionadas en presencia de ampicilina. Del total de colonias que se obtuvieron, sólo diez clones de cada transformación fueron analizados por medio de la amplificación por PCR del inserto correspondiente (dato no mostrado). De todos los clones que fueron positivos para el PCR de colonia, se seleccionó uno de cada recombinación realizada. A tales clones se les extrajo ADN plasmidial, el cual fue analizado por medio de un ensayo

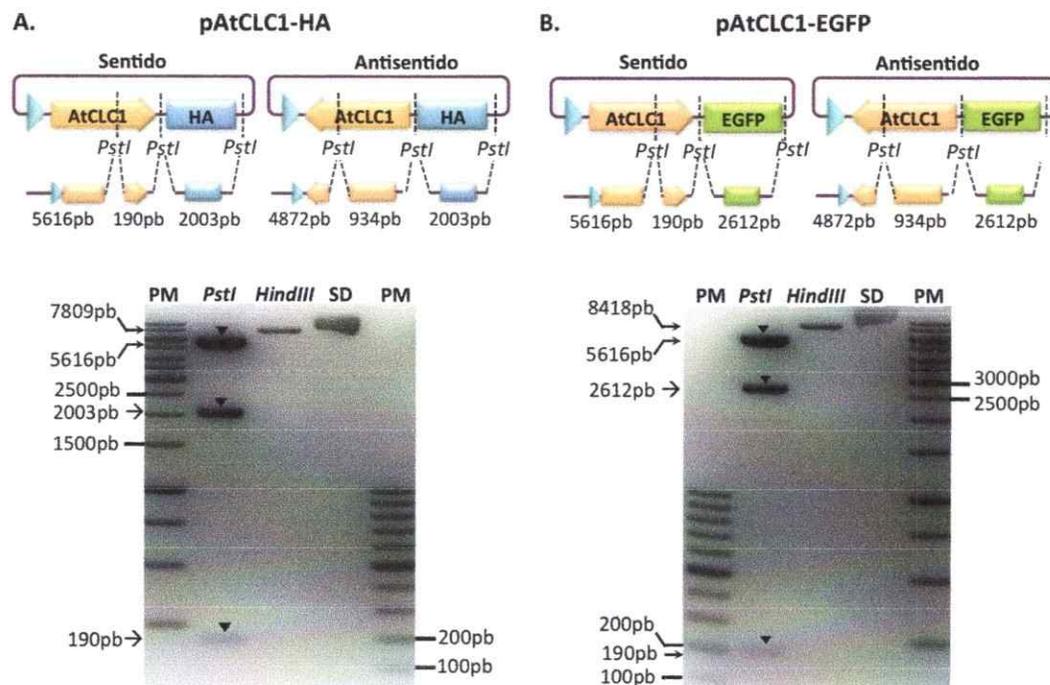


Figura 8. Análisis de la orientación de inserción de AtCLC1 en los vectores pAtCLC1-HA y pAtCLC1-EGFP, por medio de digestión enzimática. A y B (arriba) Representación gráfica de un análisis *in silico* de los vectores pAtCLC1-HA (A) y pAtCLC1-EGFP (B) digeridos con la enzima *PstI* (línea punteada). Los tamaños esperados para una disposición en Sentido y Antisentido de AtCLC1, respecto al promotor GPD (triángulos celeste), se detallan bajo la representación de cada vector. **A y B (abajo)** Electroforesis de ADN en gel de agarosa utilizando el producto de la digestión de los vectores pAtCLC1-HA (A) y pAtCLC1-EGFP (B) con la enzima *PstI* y *HindIII*. Las flechas indican los tamaños moleculares de las bandas de ADN obtenidos experimentalmente. Los triángulos negros señalan las bandas de ADN, obtenidas posterior a la digestión con *PstI*, de tamaño esperado para una orientación del inserto en sentido respecto al promotor del vector. PM: Marcador de peso molecular. SD: Vector sin digerir.

de digestión con enzimas de restricción, para determinar la orientación del inserto, respecto al promotor GPD del vector. Los vectores pAtCLC1-HA y pAtCLC1-EGFP, fueron digeridos con la enzima *PstI*. Como se observa en la Figura 8.A, el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN, obtenidos al digerir pAtCLC1-HA con *PstI*, fue congruente con lo esperado para una inserción en sentido respecto al promotor GPD (5616pb, 2003pb y 190pb). Adicionalmente, al digerir el vector pAtCLC1-EGFP, con la enzima *PstI*, se obtuvieron fragmentos de ADN cuyos tamaños se

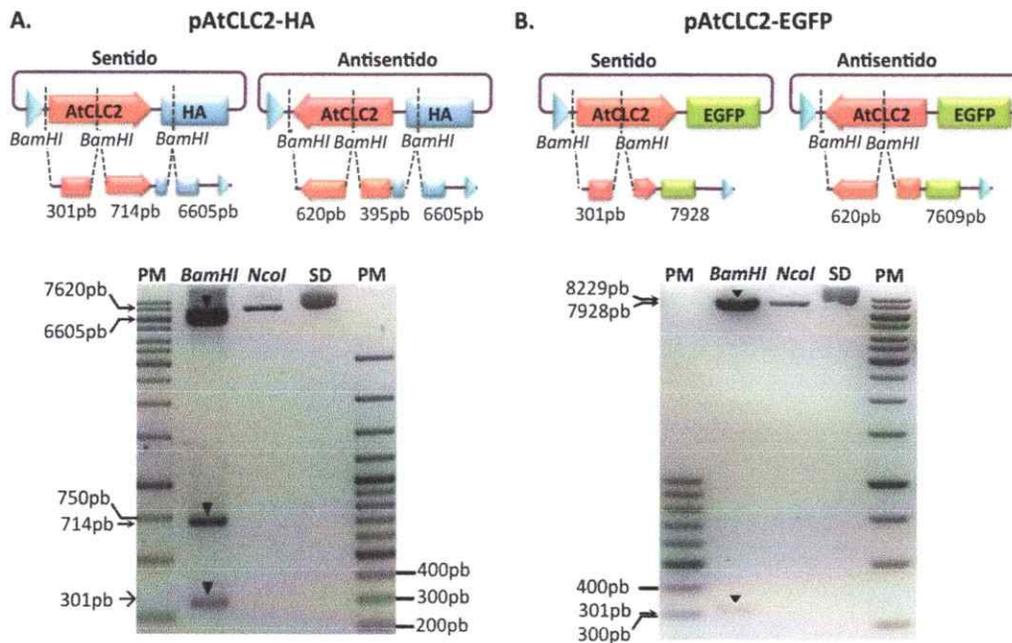


Figura 9. Determinación de la orientación de AtCLC2 en los vectores pAtCLC2-HA y pAtCLC2-EGFP, por medio de digestión con enzimas de restricción. A y B (arriba) Representación de la digestión *in silico* de los vectores pAtCLC2-HA (A) y pAtCLC2-EGFP (B) realizada con la enzima *BamHI* (línea punteada). Los tamaños esperados de los fragmentos de ADN, para una disposición en sentido y antisentido de AtCLC2, respecto al promotor GPD (triángulos celeste), se detallan bajo el dibujo de cada vector. **A y B (abajo)** Análisis del producto de la digestión de los vectores pAtCLC2-HA (A) y pAtCLC2-EGFP (B) con la enzima *BamHI* y *NcoI*, por medio de una electroforesis de ADN en gel de agarosa. Las flechas indican los tamaños moleculares de las bandas de ADN obtenidos experimentalmente. Los triángulos negros señalan las bandas de ADN, obtenidas posterior a la digestión con *BamHI*, de tamaño esperado para una orientación del inserto en sentido respecto al promotor. PM: Marcador de peso molecular. SD: Vector sin digerir.

aproximaron a lo esperado para una inserción de AtCLC1 en sentido respecto al promotor del vector (5616pb, 2612pb y 190pb; Figura 8.B). Paralelamente, ambos vectores fueron digeridos con la enzima *HindIII*, la cual corta en un solo sitio a cada vector. Esta digestión entregó como resultado una banda de ADN de tamaño aproximado al correspondiente a pAtCLC1-HA (7809pb) y pAtCLC1-EGFP (8418pb) en su forma lineal. Por otra parte, la direccionalidad de la inserción de AtCLC2 en los vectores pAtCLC2-HA y pAtCLC2-EGFP, fue determinada

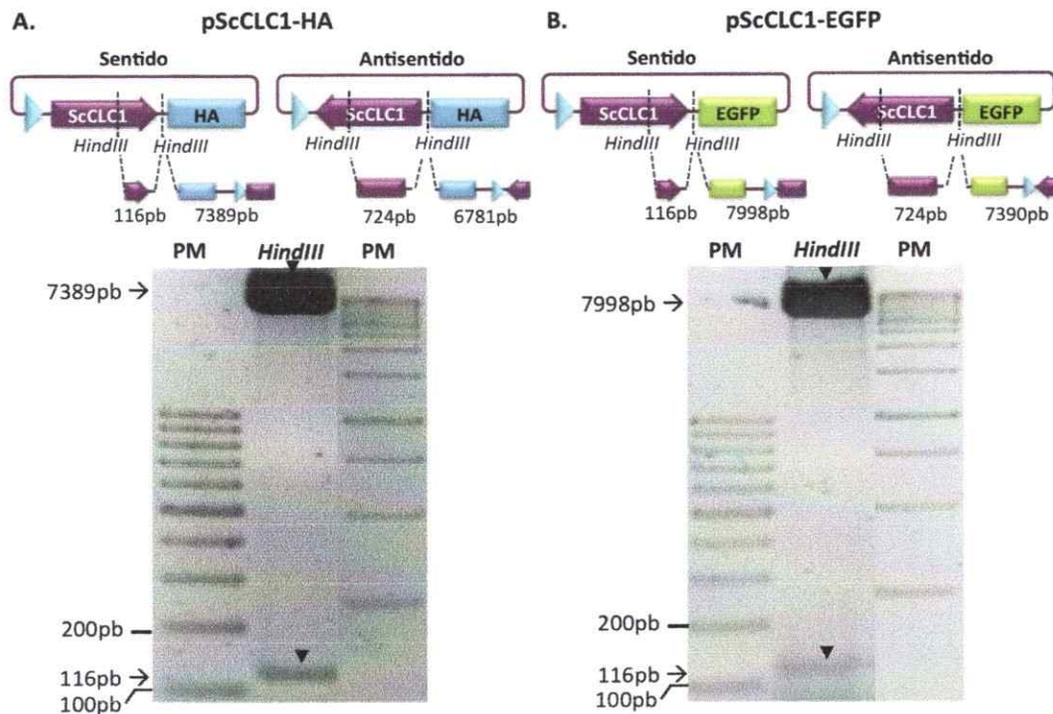


Figura 10. Análisis de la orientación de inserción de ScCLC1 en los vectores pScCLC1-HA y pScCLC1-EGFP, por medio de digestión con endonucleasas de restricción. A y B (arriba) Representación de los vectores pScCLC1-HA (A) y pScCLC1-EGFP (B) digeridos *in silico* utilizando la enzima *HindIII* (línea punteada). Debajo de cada imagen se muestran los tamaños de los fragmentos de ADN esperados posterior a la digestión, tanto para una orientación en sentido o antisentido de ScCLC1 respecto al promotor GPD (triángulos celeste). **A y B (abajo)** Electroforesis de ADN en gel de agarosa utilizando el producto de la digestión de los vectores pScCLC1-HA (A) y pScCLC1-EGFP (B) con la enzima *HindIII*. Las flechas indican los tamaños moleculares de las bandas de ADN obtenidas experimentalmente. Los triángulos negros indican las bandas de ADN, obtenidas posterior a la digestión con *HindIII*, con tamaño esperado para una orientación en sentido respecto al promotor. PM: Marcador de peso molecular. SD: Vector sin digerir.

digiriendo con la enzima *BamHI*. A partir de dichas digestiones, se obtuvieron fragmentos de ADN cuyo tamaño aproximado fue congruente con lo esperado para una inserción de AtCLC2 en sentido respecto al promotor GPD, tanto en pAtCLC2-HA (6605pb, 714pb y 301pb; Figura 9.A) y en pAtCLC2-EGFP (7928pb y 301pb Figura 9.B). Al digerir ambos vectores utilizando la enzima *NcoI* (Figura 9), la cual sólo presenta un sitio de corte en cada vector, se obtuvo una banda de ADN de tamaño aproximado al teórico en pAtCLC2-HA (7620pb) y pAtCLC2-EGFP (8229pb). Finalmente, los vectores pScCLC1-HA y pScCLC1-EGFP fueron digeridos con la enzima *HindIII*, la cual presenta dos sitios de corte en cada vector. Las bandas de ADN obtenidas luego de cada digestión, mostraron un tamaño aproximado al teóricamente predicho para una inserción de ScCLC1 en sentido respecto al promotor, tanto en el vector pScCLC1-HA (7389pb y 116pb; Figura 10.A), así como en pScCLC1-EGFP (7998pb y 116pb; Figura 10.B).

Los resultados obtenidos en los ensayos de digestión, realizados en los vectores de fusión a HA (pAtCLC1-HA, pAtCLC2-HA, pScCLC1-HA) y EGFP (pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP, pScCLC1-EGFP), permitieron concluir que cada uno de ellos presenta el inserto correspondiente, en sentido respecto al promotor GPD, dando cumplimiento al objetivo específico N° 1 de este seminario de título (Sección 5.2)

7.3 Genotipificación de las cepas *S. cerevisiae clc1* y *vps41*.

Si bien las levaduras utilizadas en este estudio, fueron obtenidas comercialmente, se procedió a ratificar su identidad genética por medio de análisis de resistencia a antibiótico y PCR a partir de ADN genómico, de acuerdo a lo recomendado por el

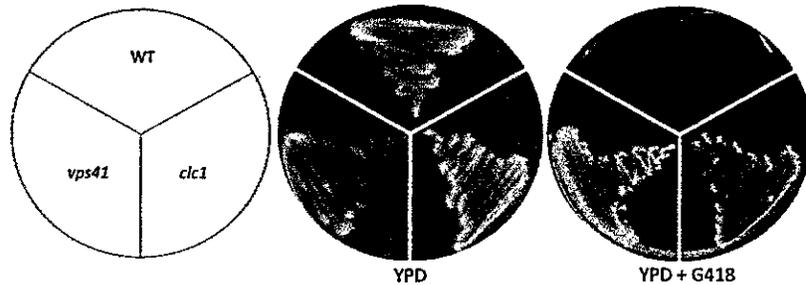


Figura 11. Ensayo de resistencia a G418 de las cepas *S. cerevisiae* BY4742 *clc1* y *vps41*, adquiridas comercialmente. Las cepas *S. cerevisiae* WT, *clc1* y *vps41* (OpenBioSystem), fueron crecidas durante 48h en medio de cultivo sólido sin G418 (YPD) y suplementado con 200µg/mL G418 (YPD + G418). La disposición de las cepas en cada tratamiento se ilustra en el diagrama izquierdo de la figura. Se observa que, las cepas *clc1* y *vps41* son resistentes a G418, mientras que la cepa WT es sensible, tal como lo describe el proveedor.

proveedor (OpenBioSystems). Según lo descrito por el proveedor, la cepa silvestre *S. cerevisiae* WT (Tabla II) es sensible al antibiótico G418. Sin embargo, las cepas *clc1* y *vps41*, las cuales carecen de las secuencias codificantes para las proteínas ScClc1 y Vps41, poseen el gen de resistencia a este antibiótico KanMX. Considerando lo anterior, el primer análisis realizado consistió en evaluar la resistencia de estas cepas al antibiótico G418. Se observó que en medio de cultivo sin antibiótico, las tres cepas fueron capaces de crecer. Sin embargo, en presencia de G418, sólo proliferaron las líneas *clc1* y *vps41* (Figura 11). Esto demuestra la sensibilidad de las levaduras silvestres (WT) a este antibiótico y la resistencia de *clc1* y *vps41* a G418, tal como lo describe el proveedor.

Adicionalmente, se procedió a evaluar por medio de PCR, la presencia de la secuencia codificante para la resistencia a G418 (KanMX), en el marco de lectura abierto correspondiente al gen ScCLC1 y VPS41 de las cepas *clc1* y *vps41*, respectivamente (Sección 6.6.1). La estrategia de genotipificación de la cepa *clc1* por

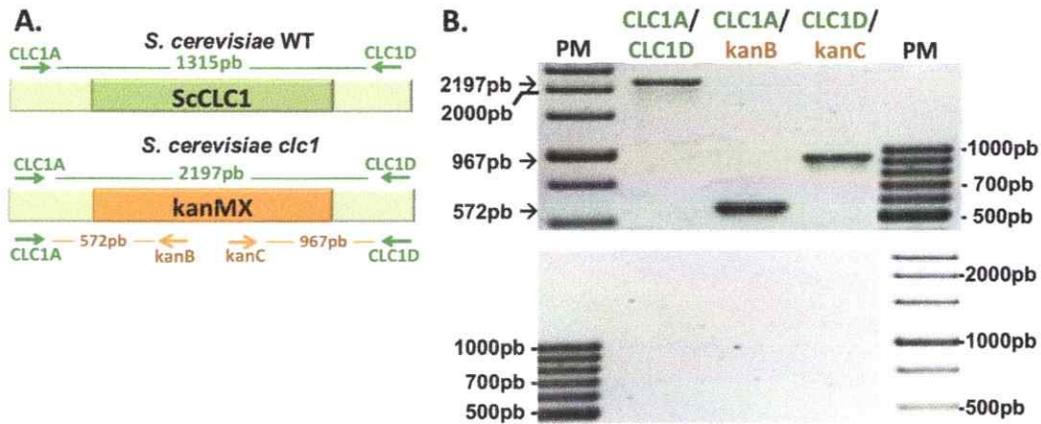


Figura 12. Genotipificación de la cepa *S. cerevisiae clc1*. *A.* Representación gráfica del locus del gen *ScCLC1* (verde claro) en una cepa de *S. cerevisiae* WT y *clc1*, de acuerdo a lo descrito por el proveedor (OpenBioSystem). La cepa WT porta la secuencia codificante de *ScCLC1* (verde oscuro), mientras que la cepa *clc1*, presenta la secuencia *KanMX* (naranja), codificante para la resistencia a G418. Al realizar reacciones de PCR, a partir de ADNg de *clc1*, utilizando los pares de partidores *CLC1A/CLC1D*, *CLC1A/kanB* y *CLC1D/kanC* (señalados con flechas) se espera obtener amplificadores de tamaño 2197pb, 572pb y 967pb, respectivamente. *B.* Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de PCR obtenidos a partir de las reacciones descritas en *A.*, utilizando como templado ADN genómico extraído desde la cepa *clc1* (gel superior) y en ausencia de templado (gel inferior). Sobre cada carril, se detallan los pares de partidores empleados en cada reacción. Al borde izquierdo del gel superior, se indican los tamaños moleculares de las bandas de ADN obtenidas, que se aproximan a lo teóricamente predicho (*A*). Se observa que los tamaños de los amplificadores obtenidos en cada reacción, se corresponden con lo descrito por el proveedor para la cepa *S. cerevisiae clc1*. PM, Marcador de peso molecular.

medio de PCR a partir de ADNg, se describe en la Figura 12.A. Como se puede observar en la Figura 12.B, el PCR realizado con los partidores *CLC1A* y *CLC1D*, produjo un amplificado de tamaño aproximado a 2197pb, lo cual es congruente con lo esperado para la cepa *clc1* según lo descrito por el proveedor. Adicionalmente, al realizar reacciones de PCR con los partidores *CLC1A/kanB* y *CLC1D/kanC* se obtuvieron amplificadores cuyos tamaños aproximados fueron concordantes con lo descrito por OpenBioSystem (572pb y 967pb, respectivamente), corroborando la identidad genética de la cepa *clc1*.

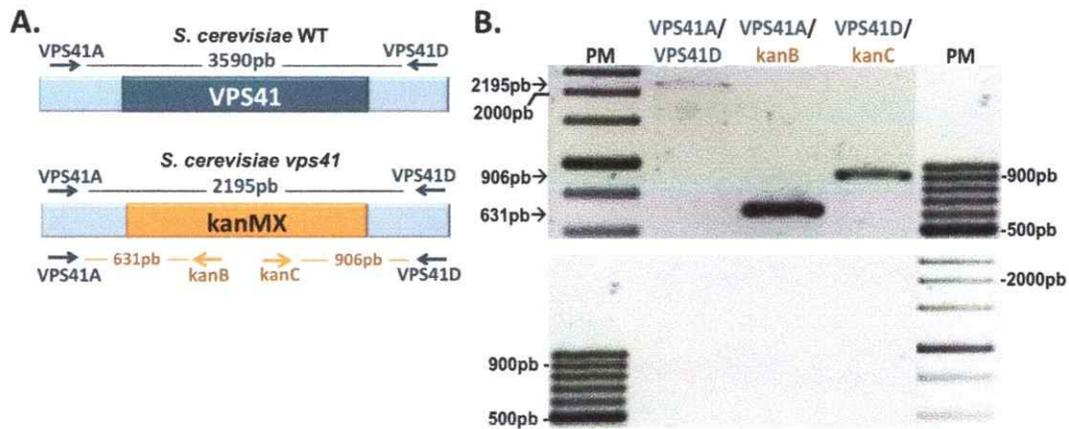


Figura 13. Genotipificación de la cepa *S. cerevisiae vps41*. **A.** Diagrama del locus del gen *VPS41* (celeste) en una cepa de *S. cerevisiae* WT y *vps41*, según lo descrito por el proveedor (OpenBioSystem). La cepa WT, presenta la secuencia codificante del gen *VPS41* (azul), mientras que la cepa *vps41* es portadora de la secuencia *kanMX* (naranja), codificante para la resistencia a G418. Reacciones de PCR fueron realizadas, utilizando ADNg de levaduras *vps41* y los pares de partidores *VPS41A/VPS41D*, *VPS41A/kanB* y *VPS41D/kanC* (señalados con flechas). A partir de dichas reacciones se espera obtener amplificadas de tamaño 2195pb, 631pb y 906pb, respectivamente. **B.** Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de PCR obtenidos a partir de las reacciones descritas en **A**, utilizando como templado ADNg extraído desde la cepa *vps41* (gel superior) o sin ADN templado (gel inferior). Sobre cada carril, se detallan los pares de partidores empleados en cada reacción. Se observa que los tamaños aproximados de los amplificadas, obtenidos en cada reacción (flechas negras), se corresponden con lo descrito por el proveedor para la cepa *S. cerevisiae vps41* (**A**). PM, Marcador de peso molecular.

La genotipificación de la cepa *vps41* se realizó de acuerdo a lo descrito en la Figura 13.A. Esta estrategia, comprendió la amplificación por PCR de una región del locus a analizar, a partir de ADNg extraído desde la cepa *vps41*. Empleando los partidores *VPS41A/VPS41D*, *VPS41A/kanB* y *VPS41D/kanC*, se obtuvieron amplificadas cuyos tamaños se aproximaron a lo teóricamente esperado (2195pb, 631pb y 906pb, respectivamente; Figura 13.B), permitiendo concluir que la cepa *vps41* efectivamente carece de dicho gen.

7.4 Obtención de *S. cerevisiae* silvestre y *clc1* que expresen constitutivamente las proteínas de fusión AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP.

Con el objetivo de estudiar la distribución subcelular de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 en *S. cerevisiae* silvestre y *clc1*, se procedió a transformar estas cepas de levaduras, con los vectores pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP y pScCLC1-EGFP, descritos previamente (Secciones 6.8.2 y 7.2). Una vez seleccionadas las levaduras transformadas, se procedió a analizar la acumulación de las proteínas correspondientes por medio de Western Blot. Para esto, las levaduras portadoras de los vectores previamente señalados, fueron crecidas en medio con presión selectiva durante 48h y posteriormente, desde cada cultivo se obtuvo un extracto de proteínas

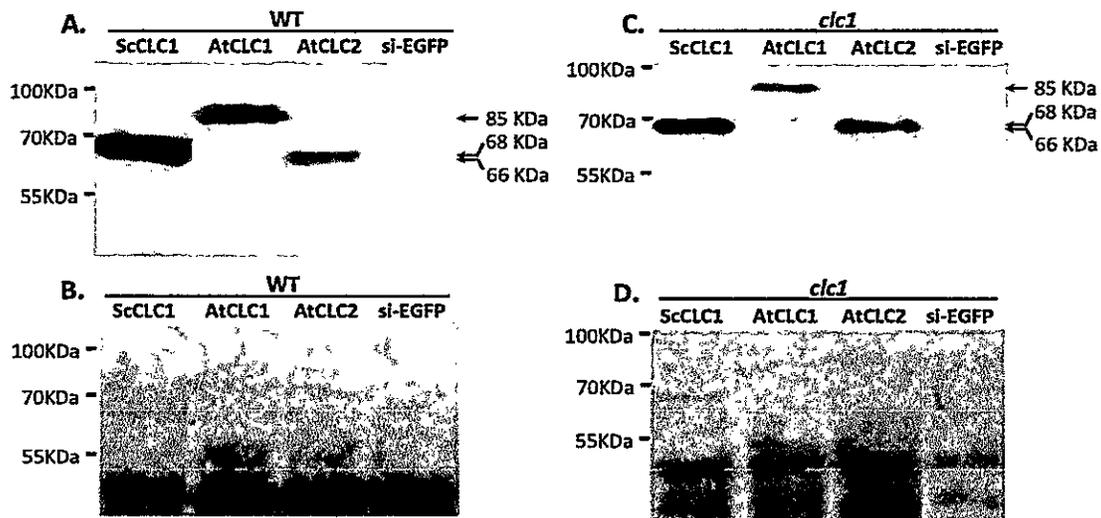


Figura 14. Análisis de la acumulación de proteínas de fusión de EGFP, de levaduras silvestre (WT) y *clc1*, transformadas con los vectores pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP y pScCLC1-EGFP. Ensayo de Western Blot realizado utilizando un anticuerpo monoclonal contra EGFP (A y C), para el análisis de los extractos de proteína obtenidos a partir de las levaduras WT (A) y *clc1* (C), transformadas con los vectores pAtCLC1-EGFP (AtCLC1), pAtCLC2-EGFP (AtCLC2), pScCLC1-EGFP (ScCLC1) y pGPD-si-EGFP (si-EGFP). B y D muestran la tinción con rojo de Ponceau de la membrana de nitrocelulosa utilizada en A y C, respectivamente. Se observa que las levaduras WT y *clc1* portadoras del vector pAtCLC1-EGFP, expresan una proteína de 85KDa. En tanto las levaduras transformadas con los vectores pAtCLC2-EGFP y pScCLC1-EGFP expresan una proteína de 68KDa y 66KDa, respectivamente. En las cepas de *Saccharomyces* transformadas con el vector pGPD-si-EGFP, no se detecta la expresión de EGFP.

totales (Sección 6.9.1). Luego, cada extracto fue sometido a un SDS-PAGE y analizado por medio de Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-EGFP (Sección 6.9.2). El resultado de este ensayo se ilustra en la Figura 14, donde se observa que tanto las levaduras silvestres (WT) y *clc1* transformadas con el vector pAtCLC1-EGFP, expresan una proteína de 85KDa capaz de ser reconocida por el anticuerpo anti-EGFP. Considerando que el valor teórico de la proteína AtClc1-EGFP es de 67KDa, el tamaño experimental obtenido presenta un error relativo (E_r) del 27%. En tanto, las cepas de levaduras portadoras de los vectores pScCLC1-EGFP y pAtCLC2-EGFP, acumularon una proteína de 66KDa y 68KDa, respectivamente. Para el caso de ScCLC1-EGFP el tamaño esperado es de 56KDa, ($E_r = 18\%$) y de AtCLC2-EGFP es de 58KDa ($E_r = 17\%$). A partir de estos resultados, se puede concluir que los vectores pAtCLC1-EGFP, pAtCLC2-EGFP y pScCLC1-EGFP, permiten la expresión en levadura de las correspondientes proteínas de fusión a EGFP. Sin embargo, se observó un incremento del tamaño experimental de las proteínas de fusión de EGFP, respecto a lo teóricamente esperado, lo cual es analizado y discutido posteriormente (Sección 8.1).

7.5 Obtención de *S. cerevisiae clc1* que expresen constitutivamente las proteínas de fusión AtClc1-HA, AtClc2-HA y ScClc1-HA.

Con la finalidad de estudiar funcionalmente la proteína AtClc1, por medio de la realización de un estudio de complementación heteróloga, se procedió a transformar la cepa *S. cerevisiae clc1* con el vector pAtCLC1-HA. En paralelo, la cepa *clc1* también fue transformada con los vectores pAtCLC2-HA y pScCLC1-HA, los cuales permitieron expresar dos Clc ya descritas, en el mismo contexto celular y genético

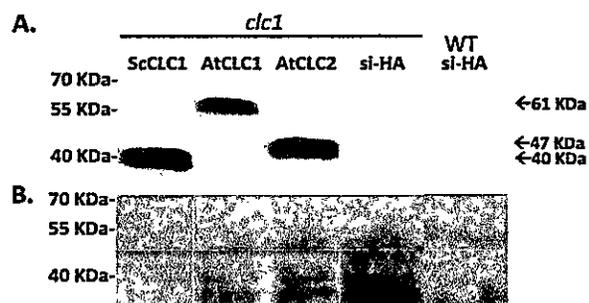


Figura 15. Análisis de la acumulación de proteínas de fusión a HA en levaduras transformadas con los vectores pAtCLC1-HA, pAtCLC2-HA y pScCLC1-HA. *A.* Western blot anti-HA, realizado a extractos de proteína obtenidos desde las levaduras *clc1* o silvestre (WT), transformadas con los vectores pScCLC1-HA (ScCLC1), pAtCLC1-HA (AtCLC1), pAtCLC2-HA (AtCLC2) o pGPD-si-HA (si-HA). *B.* Tinción con rojo de Ponceau de la membrana de nitrocelulosa utilizada en *A.* Se observa que las levaduras *clc1* portadoras del vector pAtCLC1-HA, expresan una proteína de fusión a HA de 61KDa. En tanto las levaduras transformadas con los vectores pAtCLC2-HA y pScCLC1-HA expresan una proteína de fusión a HA de 47KDa y 40KDa, respectivamente. En las cepas de *Saccharomyces* transformadas con el vector pGPD-si-HA, no se detecta la expresión de proteínas fusionadas al epítipo HA.

que AtClc1-HA. Adicionalmente, la cepa *clc1* fue transformada con el vector pGPD-si-HA, con el propósito de utilizarlo como control negativo. Finalmente, las levaduras silvestres, también fueron transformadas con el vector pGPD-si-HA, de modo de poder analizar el comportamiento de esta cepa, en el mismo contexto experimental que la línea *clc1*. Posterior a la obtención de las levaduras transformantes, se procedió a analizar la presencia de las correspondientes proteínas de fusión, en extractos de proteína provenientes de cada una de las cepas. La detección de las proteínas de fusión, se realizó por medio de un ensayo de Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo HA.

Como se puede observar en la Figura 15, en las levaduras *clc1* portadoras del vector pAtCLC1-HA, se detectó la acumulación de una proteína de 61KDa, cuyo tamaño presenta un E_r de un 39% respecto al valor teórico de AtClc1-HA (44KDa). En tanto, la proteína de fusión AtClc2-HA, mostró un tamaño experimental de 47KDa, lo cual

es mayor a los 35KDa teóricamente esperados ($Er = 34\%$). Finalmente, el tamaño experimentalmente obtenido de ScClc1-HA fue de 40KDa, con un Er del 21% respecto a lo esperado (33KDa). Este aumento en el tamaño experimental de las proteínas de fusión de HA, fue congruente con el mayor tamaño experimental registrado en las proteínas de fusión de EGFP (AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP; Sección 7.4). Dada la relación entre ambos resultados, las posibles causas de estas observaciones se discuten en conjunto en la sección 8.1 de este Seminario de Título.

7.6 Determinación de la localización subcelular de AtClc1.

En estudios previos se ha descrito que tanto ScClc1 así como AtClc2 se distribuyen en el citoplasma de *Saccharomyces* y *Arabidopsis*, respectivamente (Konopka C. y col., 2008; Newpher T. y col. 2005). Desde dicho lugar, se relocalizan en distintas membranas celulares para su interacción con otras proteínas que median la formación de CCV (Konopka C. y col., 2008; Newpher T. y col. 2005). Sin embargo la distribución subcelular de AtClc1, no ha sido descrita con anterioridad. Para evaluar si AtClc1 posee una localización similar a ScClc1 y AtClc2 en *Saccharomyces*, se procedió a determinar la disposición subcelular de AtClc1 fusionada a la proteína fluorescente verde EGFP (AtClc1-EGFP). Para esto se analizó por medio de microscopía confocal, las levaduras transformadas con el vector pAtCLC1-EGFP, en las que previamente se corroboró la expresión constitutiva de la proteína de fusión AtClc1-EGFP (Sección 7.4). El mismo análisis fue realizado en levaduras que expresaron constitutivamente las proteínas AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP (Sección 7.4) para realizar la comparación correspondiente.

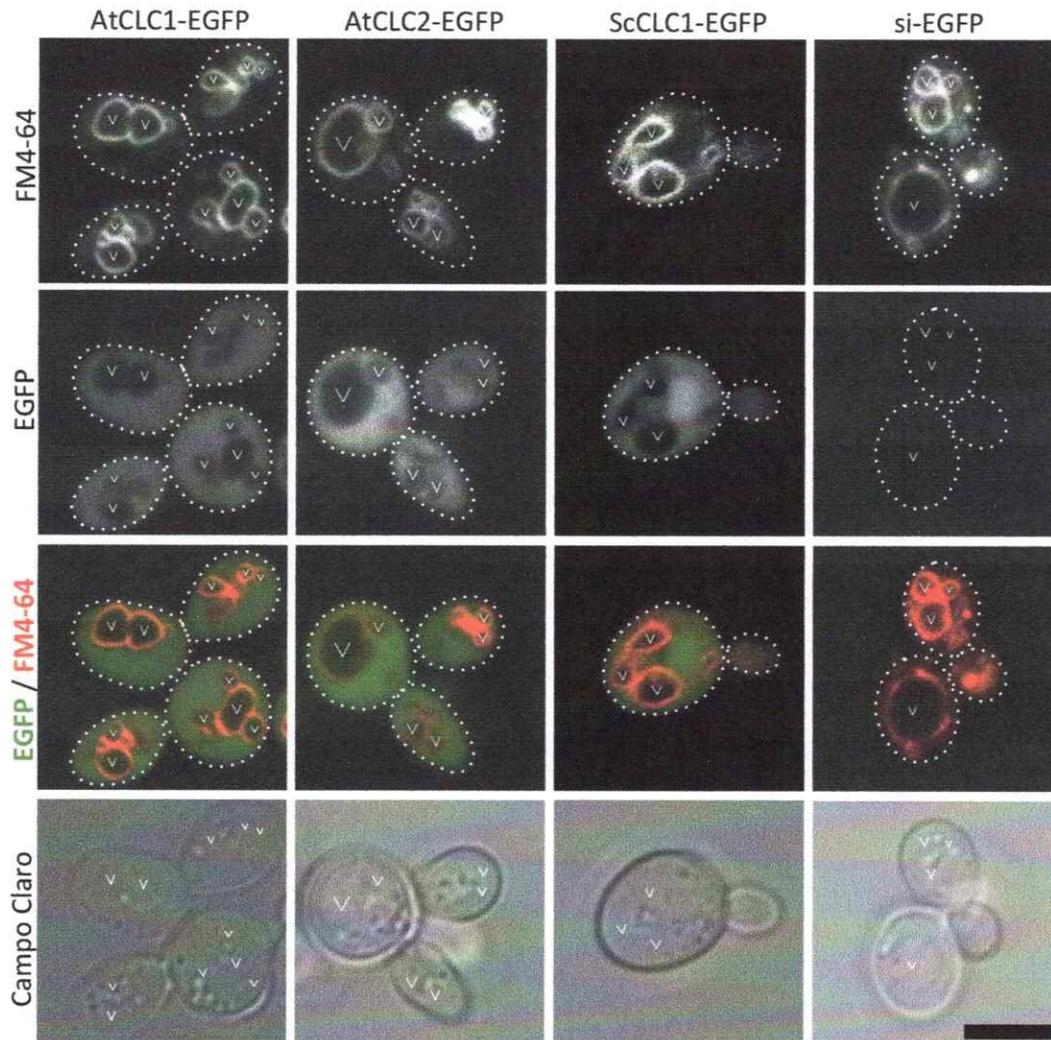


Figura 16. Análisis de la distribución subcelular de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 fusionadas a EGFP, en *S. cerevisiae* silvestre. Las cepas de levaduras silvestres que expresan constitutivamente las proteínas AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP, así como la cepa portadora del vector pGPD-si-EGFP (si-EGFP), fueron tratadas con FM4-64 (20µM) durante 30min, permitiendo teñir las membranas vacuolares de las células. Posterior al tratamiento, 50 células de cada cepa previamente señalada, fueron analizadas por medio de microscopía confocal. En la figura se muestra una imagen representativa (>80%) de cada población celular que fue observada. La señal de emisión de FM4-64 y EGFP se muestran en la primera y segunda fila de imágenes, respectivamente. La superposición de ambas señales de emisión se ilustra en la fila EGFP/FM4-64, donde EGFP se representa en color verde y FM4-64 en color rojo. Se observa además la imagen en campo claro de las levaduras analizadas. El espacio vacuolar se representa con una letra V. Con una línea punteada se delimitó el borde celular, a partir de las imágenes de campo claro. La barra de tamaño representa 5µm.

Debido a que en *Saccharomyces* las vacuolas abarcan la mayoría del volumen intracelular, se procedió a marcar el límite de estos compartimentos, previo a la determinación de la locación de las proteínas Clc fusionadas a EGFP. Con tal propósito, el análisis se llevó a cabo a partir de un cultivo de levaduras tratadas durante 30min con FM4-64 (20 μ M). Esta tinción, tiene la capacidad de adherirse a la membrana plasmática de las células y fluorescer en este ambiente lipídico. En condiciones fisiológicas, la membrana plasmática es internalizada por medio de la ruta endocítica, llegando a formar parte de la membrana de las vacuolas de la célula.

Así, luego de 30min de incubación con FM4-64, las membranas vacuolares contendrán esta tinción en su estructura, permitiendo observar por medio de microscopía de fluorescencia, el límite de este compartimento subcelular (Sección 6.10, Figura 4).

Posterior al tratamiento con FM4-64, se procedió a observar células de cada cultivo por medio de microscopía confocal, de acuerdo a lo descrito en la sección 6.10. En primer lugar, se analizó la distribución de las proteínas Clc fusionadas a EGFP, en las cepas de *Saccharomyces silvestre* (Figura 16). Los resultados revelaron que tanto AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP se distribuyen en un espacio celular que excluye los compartimentos vacuolares, visualizados con FM4-64 (Figura 16). Esta observación se correlaciona con lo descrito previamente, respecto de una proteína que presenta localización subcelular citoplasmática en *Saccharomyces* (Huh W. Y cols., 2003).

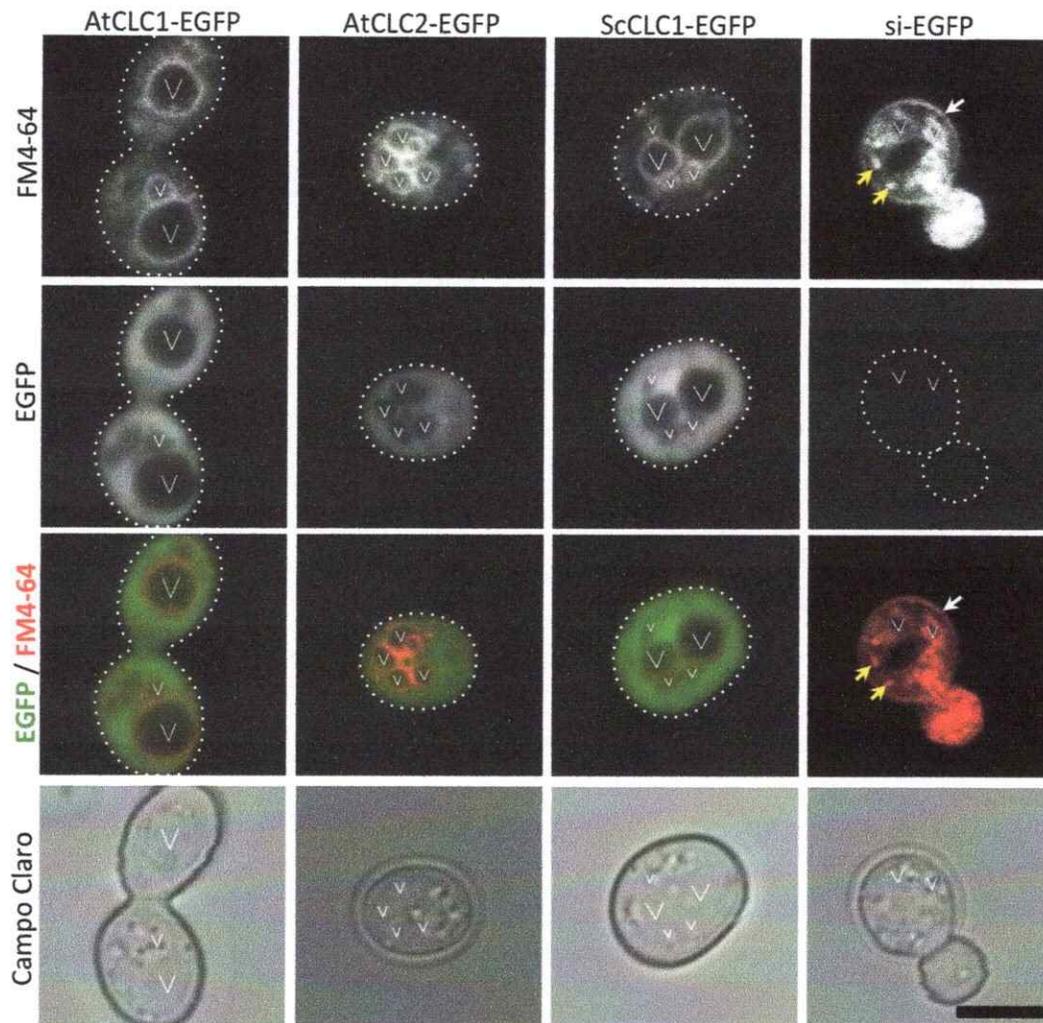


Figura 17. Determinación de la distribución subcelular en *S. cerevisiae clc1* de las proteínas AtClc1, AtClc2 y ScClc1 fusionadas a EGFP. Las células de *Saccharomyces clc1*, que expresan las proteínas AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP o son portadoras del vector pGPD-si-EGFP (si-EGFP), fueron incubadas en FM4-64 (20 μ M) por 30min, permitiendo demarcar la membrana de las vacuolas de la célula y observar el espacio comprendido por este compartimento subcelular, señalado con una letra V. Transcurrido este tiempo, a partir de cada cepa previamente descrita, se observaron 50 células por medio de microscopía confocal. En la figura se ilustra una imagen representativa (>80%) de cada población celular. Para cada imagen se muestra la señal de emisión de FM4-64 (Primera fila), EGFP (Segunda fila) y la superposición de la señal de emisión de FM4-64 (en color rojo) y EGFP (en color verde), en la tercera fila. Adicionalmente, se incluye la imagen en campo claro de las levaduras evaluadas. El límite celular se ilustra con una línea punteada o se indica con una flecha blanca, según corresponda. Con flechas amarillas se señalan compartimentos endosomales en la cepa *clc1*-si-EGFP. La barra de tamaño representa 5 μ m.

La localización de AtClc1-EGFP en levaduras silvestres podría verse alterada, debido a la presencia de la proteína funcional ScClc1 endógena de la célula. Esta co-expresión podría dar pie a una competencia entre ambas proteínas, por la interacción con otros compartimentos subcelulares, los cuales no se harían evidentes en la Figura 16. Considerando esta posibilidad, y de forma semejante al ensayo descrito previamente, se procedió a evaluar la localización subcelular de AtClc1-EGFP en levaduras *clc1*, las cuales carecen del gen ScCLC1 (Sección 7.3; Figura 12). Para esto, las células de *Saccharomyces clc1* que expresan las proteínas AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP (Sección 7.4), fueron observadas por medio de microscopía confocal, de acuerdo a lo descrito en la sección 6.10.

Los resultados de este ensayo se ilustran en la Figura 17, donde se observa que las proteínas AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP se localizan citoplasmáticamente en levaduras *clc1*, de forma semejante a lo observado en levaduras silvestres (comparar figuras 16 y 17). Cabe señalar, que la fluorescencia de EGFP es específica en levaduras WT y *clc1*, que expresan las proteínas AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP, ya que en las levaduras transformadas con el vector pGPD-si-EGFP, no se observó señal (Figuras 16 y 17, si-EGFP). Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en los análisis de Western Blot realizados con un anticuerpo contra EGFP, donde no se detectó la presencia de esta proteína en los extractos provenientes de las cepas *clc1*-si-EGFP y WT-si-EGFP (Figura 14).

En conjunto, los resultados expuestos en esta sección, permiten responder al objetivo específico N° 3 (Sección 5.2) y concluir que AtClc1 se distribuye en el citoplasma en *Saccharomyces*, semejante a lo observado en AtClc2 y ScClc1.

7.7. Ensayo de complementación heteróloga de AtCLC1 en *S. cerevisiae clc1*.

El análisis de la capacidad de AtClc1 de comportarse funcionalmente como una Clc, se realizó por medio de un ensayo de complementación heteróloga. Éste consistió en la expresión de la proteína AtClc1 fusionada al epitopo HA (AtClc1-HA), en la cepa de *S. cerevisiae clc1*, la cual carece de su único gen endógeno codificante para una Clc, ScCLC1. Se evaluó el efecto de la expresión de AtClc1-HA sobre distintos fenotipos alterados de *clc1* con respecto a la cepa parental silvestre: tasa de endocitosis disminuida, fenotipo vacuolar anormal y menor tasa de crecimiento. Como control negativo de estos ensayos, se utilizó la cepa *clc1*, transformada con el vector pGPD-si-HA (*clc1*-si-HA). En tanto como control positivo se utilizó la cepa *S. cerevisiae clc1* transformada con el vector pScCLC1-HA (*clc1*-ScCLC1-HA), el cual permite la expresión constitutiva de la proteína ScClc1 endógena de *Saccharomyces*. En paralelo, se evaluó el efecto de la expresión de AtClc2-HA en la cepa *clc1* (*clc1*-AtCLC2-HA), la cual se utilizó como modelo comparativo de otra Clc de *Arabidopsis*. Adicionalmente, cada uno de los fenotipos analizados en la cepa *clc1*-si-HA, también fue evaluado y comparado con lo observado en levaduras silvestres transformadas con el vector pGPD-si-HA (WT-si-HA), como una forma de corroborar los antecedentes descritos en la literatura, respecto al comportamiento de la cepa *clc1*.

7.7.1 Evaluación de la capacidad de AtClc1-HA de revertir la menor tasa de endocitosis de *S. cerevisiae clc1*.

Se ha descrito que la cepa *S. cerevisiae clc1*, presenta una menor tasa de endocitosis, si se compara con células silvestres de *Saccharomyces* (Huang K. y cols, 1997). Considerando esto, se procedió a evaluar la capacidad de AtClc1-HA de revertir esta condición en células *clc1*. Dicha evaluación se llevó a cabo utilizando el marcador fluorescente FM4-64, el cual se intercala en la membrana plasmática de las células y posteriormente, es endocitado hacia compartimentos endosomales, tal como se ilustra en el esquema de la Figura 4. La cinética de endocitosis de FM4-64 fue evaluada en las levaduras *clc1*-AtCLC1-HA, *clc1*-AtCLC2-HA, *clc1*-ScCLC1-HA, *clc1*-si-HA y WT-si-HA. Las células fueron incubadas en FM4-64 (20 μ M) durante 30min a 4°C. Posteriormente, la tinción fue lavada e inmediatamente las levaduras fueron observadas por medio de microscopía confocal, momento que fue considerado como tiempo 0min. Posteriormente, la incubación se realizó a 28°C y se procedió a observar las células a los 4, 8 y 12min. Para cada tiempo, se analizó la presencia de FM4-64 en el límite celular de las levaduras observadas.

En primer lugar, se procedió a validar el modelo experimental propuesto anteriormente. Para ello, se evaluó la cinética de endocitosis de las cepas WT-si-HA y *clc1*-ScCLC1-HA, las que fueron comparadas con el comportamiento de las levaduras *clc1*-si-HA. En la Figura 18 se puede observar que en las tres cepas analizadas a tiempo inicial (0min), el FM4-64 se dispuso en el borde celular, correspondiente a la membrana plasmática. Transcurridos ocho minutos, el FM4-64 no fue detectado en la membrana plasmática de levaduras WT-si-HA ni de células

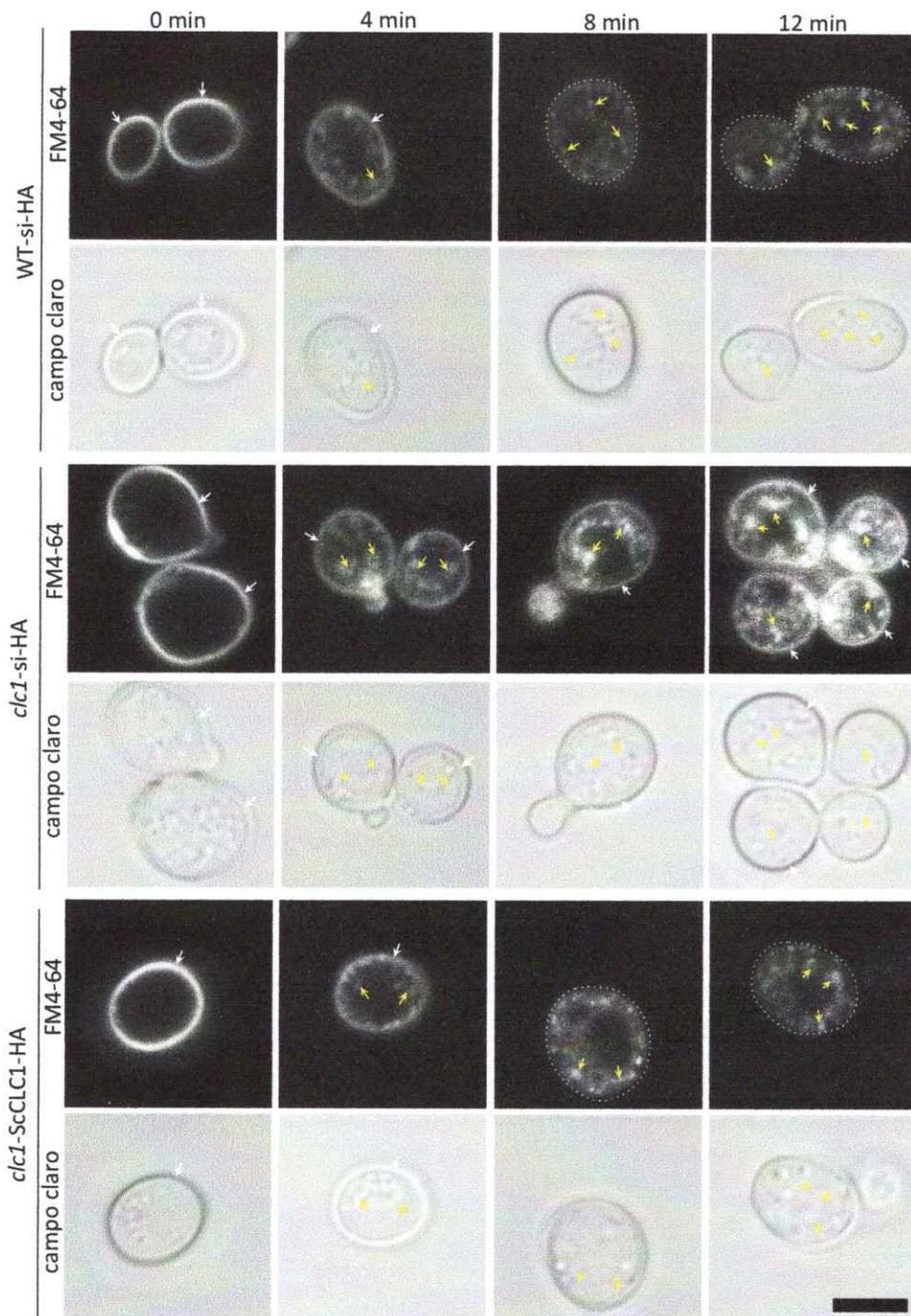


Figura 18. Evaluación de la cinética de endocitosis de FM4-64 en cepas de levaduras WT-si-HA, *clc1*-si-HA y *clc1*-ScCLC1-HA. La validación del modelo experimental propuesto en la sección 7.7.1 se realizó analizando la endocitosis de FM4-64 en células con fondo genético silvestre (WT-si-HA) y mutante (*clc1*-si-HA y *clc1*-ScCLC1-HA). Las células fueron incubadas en FM4-64 (20 μ M) y la endocitosis del marcador fue evaluada por medio de microscopía confocal, a los 0min, 4min, 8min y 12min, de acuerdo a lo descrito en la sección 6.11.1. Para cada tiempo, se observaron 20 células y se eligieron imágenes representativas de cada población (>80%), las cuales se ilustran en esta figura. El experimento fue repetido tres veces de manera independiente. Para cada cepa evaluada, se muestra la señal de emisión de FM4-64 y el campo claro de la imagen adquirida. Se observa que inicialmente (tiempo 0min), FM4-64 se encuentra en la membrana plasmática de las levaduras, señalada con flecha blanca. Posteriormente, la tinción se endocita en compartimentos endosomales (flechas amarillas), desapareciendo del borde celular, el cual se demarca con una línea punteada. Barra de tamaño, 5 μ m.

clc1-ScCLC1-HA, habiéndose internalizado en estructuras endosomales (Figura 18, 8min y 12min; Vida T. y Erm S., 1995). Congruentemente con lo descrito en la literatura, la cinética de endocitosis en levaduras carentes de ScClc1 (*clc1*-si-HA) fue menor a lo registrado por levaduras que expresan esta proteína (WT-si-HA y *clc1*-ScCLC1-HA; Huang K. y cols, 1997). Si bien el FM4-64 fue endocitado en endosomas en las células *clc1*-si-HA (Figura 18, *clc1*-si-HA, flechas amarillas), también fue detectado en la membrana plasmática durante todo el curso del experimento (Figura 18, *clc1*-si-HA, flechas blancas). Estos resultados ratificaron el hecho de que la cepa *clc1* presenta una menor tasa de endocitosis comparado con la línea silvestre y permitió validar el sistema de estudio planteado para el análisis de este fenotipo.

Una vez validado el modelo experimental, se analizó la cinética de endocitosis de FM4-64 en las cepas *clc1*-AtCLC1-HA y *clc1*-AtCLC2-HA. En la Figura 19, se observa que a los cuatro minutos las levaduras internalizaron FM4-64 desde el límite celular hacia compartimentos endosomales, manteniendo un remanente de la tinción en la membrana plasmática, por al menos ocho minutos (Figura 19; 0, 4 y 8min, flechas blancas). En tanto, al observar las células a los doce minutos, no fue posible detectar FM4-64 en la membrana plasmática de levaduras *clc1*-AtCLC1-HA ni *clc1*-AtCLC2-HA (Figura 19, 12min). Estos resultados permiten concluir que la expresión de AtClc1-HA complementa parcialmente la menor tasa de endocitosis en levaduras carentes de ScClc1 (*clc1*-si-HA), acelerando la internalización de FM4-64 en estas células (comparar Figura 18 ScCLC1-HA y Figura 19 AtCLC1-HA, 12min). Adicionalmente, AtClc1-HA complementó la cepa *clc1* en igual grado que AtClc2-

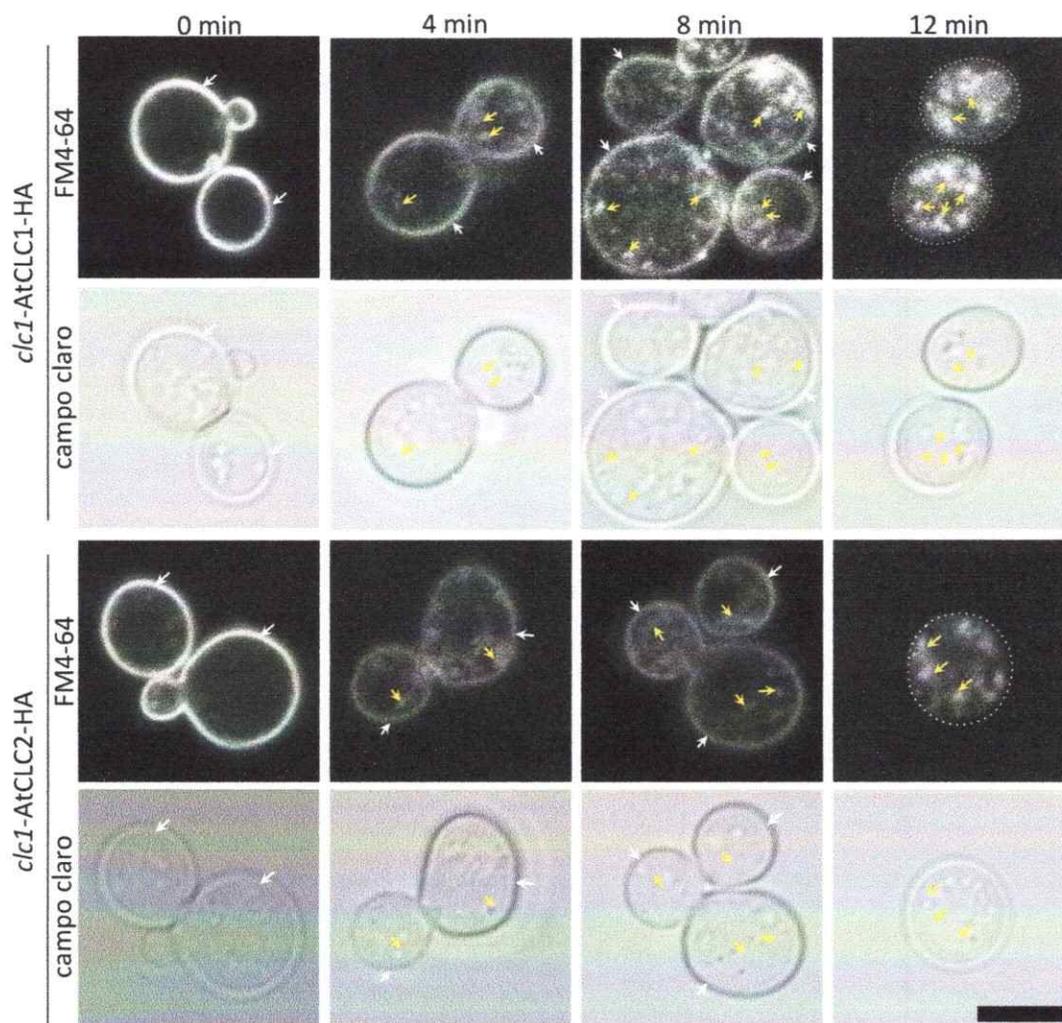


Figura 19. Endocitosis de FM4-64 en *Saccharomyces clc1-AtCLC1-HA* y *clc1-AtCLC2-HA*. Las cepas de levadura *clc1-AtCLC1-HA* y *clc1-AtCLC2-HA*, fueron incubadas con FM4-64 (20 μ M) y su endocitosis fue observada por medio de microscopía confocal a los 0min, 4min, 8min y 12min, según lo descrito en la sección 6.11.1. Veinte células fueron observadas en cada tiempo señalado. El experimento se repitió tres veces de manera independiente. Se seleccionaron imágenes representativas (>80%). Se observa que a tiempo 0min FM4-64 se encuentra en la membrana plasmática de las células (flechas blancas) y posteriormente, se endocita en compartimentos endosomales (flechas amarillas). A los doce minutos, la tinción no se detecta en el borde celular (línea punteada), sino sólo en endosomas. Barra de tamaño, 5 μ m.

HA (Figura 19, 12min), comportándose de forma semejante a una Clc de Arabidopsis ya estudiada.

7.7.2 Análisis de la capacidad de AtClc1-HA de complementar el fenotipo multivacuolar de la cepa *clc1*.

En células silvestres de *Saccharomyces*, las vacuolas se observan como compartimentos esféricos, cuyo número varía entre uno y tres por célula (Seeley S. y

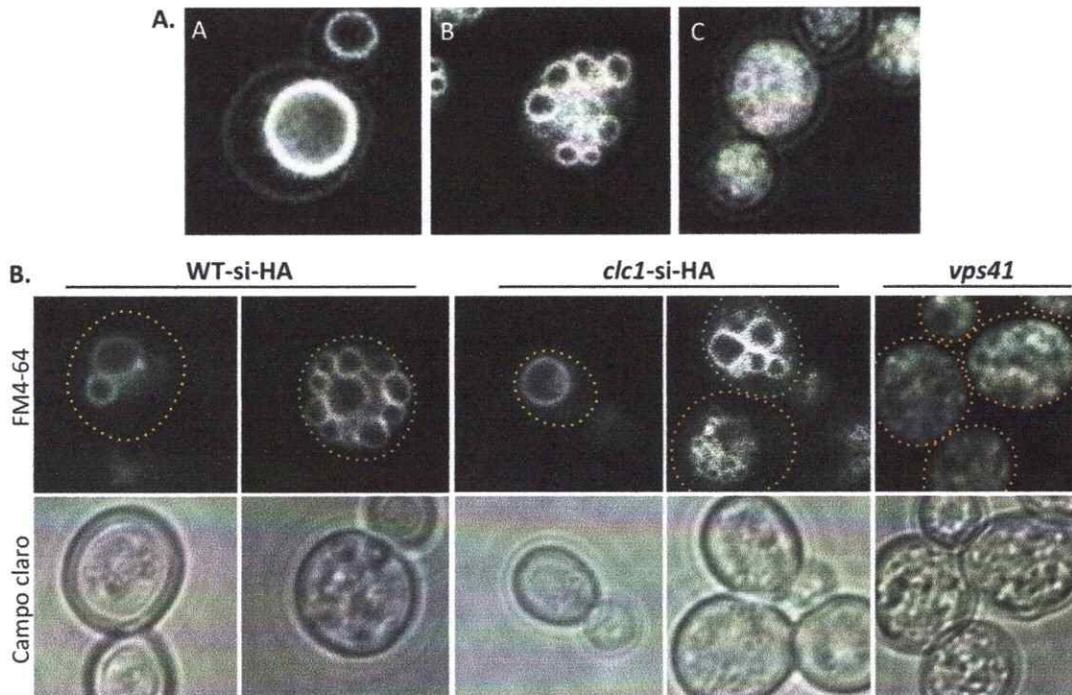


Figura 20. Análisis del fenotipo vacuolar de células de *Saccharomyces* WT-si-HA, *clc1*-si-HA y *vps41*. *A.* Imagen modificada de Seeley y cols. (2002), la cual ilustra células de *Saccharomyces* con morfología vacuolar tipo “A”, “B” y “C”. En esa figura se muestran levaduras crecidas en medio de cultivo suplementado con FM4-64 (3 μ M) durante 20-24h, las que posteriormente, fueron observadas por medio de microscopía de fluorescencia. *B.* Las cepas de levaduras *vps41*, WT-si-HA y *clc1*-si-HA fueron crecidas en las mismas condiciones descritas en *A* (sección 6.11.2) y observadas por medio de microscopía confocal. En la figura se muestran los fenotipos vacuolares que fueron distinguidos en la población celular de cada una de las cepas señaladas, por medio de la observación de FM4-64. Para cada célula se delimitó el borde celular con una línea punteada, de acuerdo a su respectiva imagen en campo claro. El color de la línea punteada representa el fenotipo vacuolar de dicha célula: amarillo, “A”; verde, “B”; naranja “C”. La barra de tamaño representa 5 μ m.

cols., 2002), fenotipo que en este Seminario es denominado tipo "A" (Figura 20.A). Sin embargo, un análisis realizado por Seeley S. y cols. el año 2002, reveló que las levaduras *clc1* presentan una morfología vacuolar alterada, la cual fue denominada por Seeley S. y cols., 2002 como fenotipo vacuolar "B" y "C" (Figura 20.A). La morfología vacuolar tipo "B" se caracteriza por presentar múltiples compartimentos esféricos. En tanto, la morfología tipo "C", se caracteriza por poseer un mayor número de vacuolas, pero de menor tamaño a las observadas en la morfología "B" (Figura 20.A). Según lo descrito en la literatura, el 50% de la población de *clc1* presenta fenotipo vacuolar "B" y un 40% muestra fenotipo "C" (Seeley S. y cols., 2002). Teniendo esto en consideración, se procedió a analizar el fenotipo vacuolar de las levaduras *clc1*-AtCLC1-HA, *clc1*-AtCLC2-HA, *clc1*-ScCLC1-HA, *clc1*-si-HA y WT-si-HA, replicando el procedimiento seguido por Seeley S. y cols. (2002). Para esto, cada cepa fue incubada durante 20 a 24hr en YMM suplementado con FM4-64 (3 μ M), de acuerdo a lo descrito en la sección 6.11.2. De este modo, la tinción fue localizada en la membrana de las vacuolas de cada célula. Interesantemente, Dr. Seeley S. observó que alzas de temperatura durante el curso del experimento, pueden afectar el fenotipo vacuolar de las células (datos no publicados, aportados personalmente). Debido a esto, la cepa carente del gen VPS41 (*vps41*), se utilizó como control externo del ensayo. Dicha cepa fue escogida debido a que se ha descrito que el 100% de su población presenta un fenotipo vacuolar tipo "C" (Seeley y cols., 2002). De este modo, si alzas de temperaturas llegasen a ocurrir durante el desarrollo del experimento, el tamaño de las vacuolas de la cepa *vps41* se vería aumentado, asemejándose al fenotipo "A" o "B". Así, los experimentos que se consideraron para el análisis del fenotipo vacuolar de las distintas cepas previamente descritas, fueron

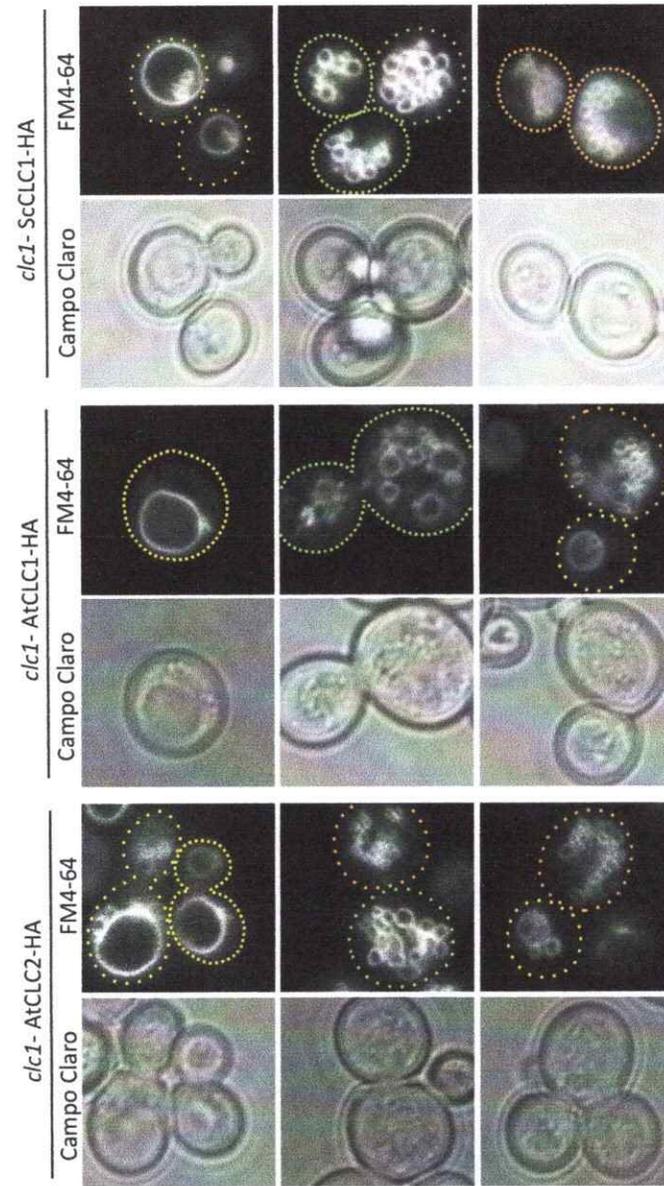


Figura 21. Análisis del fenotipo vacuolar en la población celular de *Saccharomyces clc1-ScCLC1-HA*, *clc1-AtCLC1-HA* y *clc1-AtCLC2-HA*. Las levaduras *clc1-ScCLC1-HA*, *clc1-AtCLC1-HA* y *clc1-AtCLC2-HA*, fueron crecidas en medio de cultivo con FM4-64 ($3\mu\text{M}$) durante 20-24h y posteriormente se observaron por medio de microscopía confocal (Sección 6.11.2). En la figura se ilustran los fenotipos vacuolares observados al evaluar la distribución de FM4-64, en las levaduras de cada población analizada. El límite celular se muestra con una línea punteada, según su respectiva imagen en campo claro. El color de cada línea punteada simboliza el fenotipo vacuolar observado en la célula: amarillo, "A"; verde, "B"; naranja "C". La barra de tamaño representa $5\mu\text{m}$.

todos aquellos en los que las levaduras *vps41*, se comportaron como lo describe la literatura (Figura 20.B, *vps41*).

Al evaluar el fenotipo vacuolar de la cepa silvestre WT-si-HA, se observaron células con vacuolas tipo “A” y “B” (Figura 20.B, WT-si-HA). Como se puede observar en la Figura 22, de los dos fenotipos registrados, un alto porcentaje de la población WT-si-HA mostró fenotipo “A” (89,8% “A” \pm 1,1%, 10,3% “B” \pm 1,1%, 0,0% “C” \pm 0,0%). Por otra parte, al analizar la cepa *clc1*-si-HA se observaron células con fenotipo “A”, “B” y “C” (Figura 20.B, *clc1*-si-HA). Sin embargo, al contrario de lo ocurrido por la población WT-si-HA (10,3% “B” \pm 1,1%, 0,0% “C” \pm 0,0%), la mayoría de las células *clc1*-si-HA mostró fenotipo “B” y “C” (43,3% “B” \pm 4,1%, 50,5% “C” \pm 0,6%; Figura 22). Adicionalmente, las levaduras *clc1*-si-HA presentaron una disminución estadísticamente significativa del fenotipo “A” (6,3% “A” \pm 3,5%; Figura 22), respecto a la cepa WT-si-HA (89,8% “A” \pm 1,1%). Paralelamente, al evaluar el fenotipo vacuolar de la cepa *clc1*-ScCLC1-HA, tanto los fenotipos “A”, “B” y “C” fueron distinguidos en la población (Figura 21, *clc1*-ScCLC1-HA). Al cuantificar la distribución de los distintos fenotipos de la cepa *clc1*-ScCLC1-HA, se observó un aumento estadísticamente significativo de la población con fenotipo “A” (71,9% \pm 5,5%) y una disminución del porcentaje de células con fenotipo “B” y “C” (25,1% “B” \pm 4,1%, 3,0% “C” \pm 1,4%), respecto a las levaduras *clc1*-si-HA (6,3% “A” \pm 3,5%, 43,3% “B” \pm 4,1%, 50,5% “C” \pm 0,6%; Figura 22). Estos resultados permitieron validar esta estrategia experimental, para analizar el fenotipo vacuolar en *Saccharomyces*, debido a que estadísticamente, la expresión de ScClc1-HA en la cepa *clc1*, complementó el fenotipo defectuoso de la mutante.

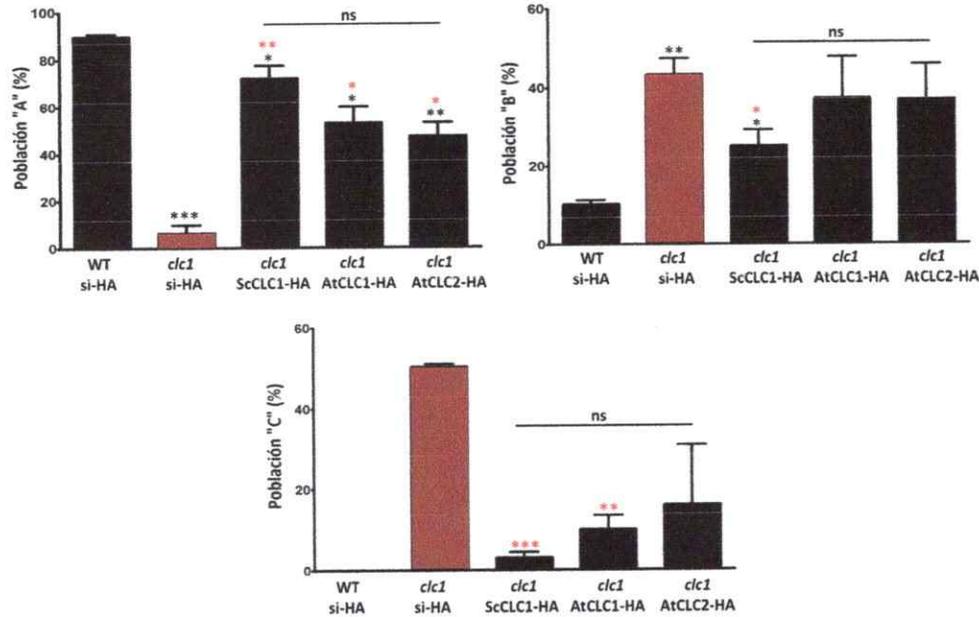


Figura 22. Distribución porcentual de las poblaciones celulares con fenotipos "A", "B" o "C", en las cepas de levadura WT-si-HA, *clc1*-si-HA, *clc1*-ScCLC1-HA, *clc1*-AtCLC1-HA, *clc1*-AtCLC2-HA. Los fenotipos vacuolares de las cepas de levadura analizadas en esta figura, fueron clasificados en "A", "B" y "C", según la figura 20.A. La cuantificación de dichos fenotipos, se ilustra en los gráficos correspondientes a cada cepa. Para cada ensayo, 110-150 células fueron analizadas. El experimento fue repetido dos veces de manera independiente. Un análisis estadístico t-test de datos no apareados fue realizado comparando cada cepa con WT-si-HA y con *clc1*-si-HA: las diferencias estadísticamente significativas respecto a WT-si-HA se muestran con asterisco negro y respecto a *clc1*-si-HA, con asterisco rojo (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Un análisis de varianza de una vía fue llevado a cabo comparando las cepas *clc1*-ScCLC1, *clc1*-AtCLC1 y *clc1*-AtCLC2 (ns, diferencias no significativas, $P > 0,05$).

Al evaluar la morfología vacuolar de las levaduras *clc1*-AtCLC1-HA, se observaron células con fenotipo "A", "B" y "C" (Figura 21). La distribución poblacional de la cepa *clc1*-AtCLC1-HA (Figura 22), arrojó un significativo aumento de las levaduras con vacuolas tipo "A" ($52,9\% \pm 7,1\%$) y una disminución del porcentaje de células con fenotipo "B" ($37,2\% \pm 10,5\%$) y "C" ($9,9\% \pm 3,5$), respecto a lo observado en la cepa *clc1*-si-HA ($6,3\%$ "A" $\pm 3,5\%$, $43,3\%$ "B" $\pm 4,1\%$, $50,5\%$ "C" $\pm 0,6\%$; Figura 22). Estos resultados permiten concluir que la expresión de AtClc1-HA, complementa el

fenotipo multivacuolar de levaduras *clc1*, aumentando significativamente la población con fenotipo vacuolar silvestre (“A”) y disminuyendo aquella con morfología tipo “C”.

Finalmente, al realizar un análisis de varianza (ANOVA) al conjunto de poblaciones *clc1*-ScCLC1-HA, *clc1*-AtCLC1-HA y *clc1*-AtCLC2-HA, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la distribución porcentual de cada fenotipo vacuolar (Figura 22, ns). Esto permite inferir que la expresión de AtClc1-HA en levaduras *clc1*, tiene un efecto en la morfología vacuolar semejante al generado por la expresión de ScClc1-HA y AtClc2-HA, dos cadenas livianas de clatrina descritas funcionalmente en la literatura.

7.7.3 Evaluación de la capacidad de AtClc1 de complementar la menor tasa de crecimiento presente en *S. cerevisiae clc1*.

Antecedentes previos muestran que la carencia de ScClc1 en *S. cerevisiae clc1*, disminuye la tasa de crecimiento de la cepa, comparado con lo observado en levaduras silvestres (Huang K. y cols, 1997). Para evaluar la capacidad de AtClc1 de revertir este fenotipo en levaduras *clc1*, se procedió a analizar la cinética de crecimiento de las levaduras *clc1*-AtCLC1-HA, *clc1*-AtCLC2-HA, *clc1*-ScCLC1-HA, *clc1*-si-HA y WT-si-HA. Las células fueron crecidas durante 13h en placas de 96 pocillos con agitación constante. La densidad óptica de cada cultivo a los 620nm (DO_{620nm}), fue evaluada cada una hora y relativizada a la DO_{620nm} de cada cultivo al tiempo inicial del ensayo. En la figura 23 se puede observar que la cepa de levaduras *clc1*-si-HA presentó una menor tasa de crecimiento que la cepa WT-si-HA, tal como

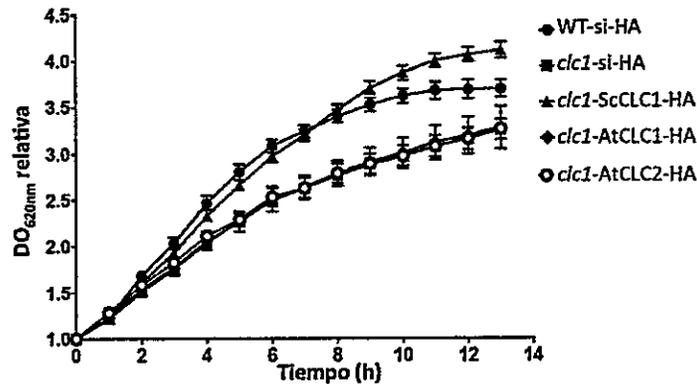


Figura 23. Análisis del crecimiento de las cepas WT-si-HA, *clc1*-si-HA, *clc1*-ScCLC1-HA, *clc1*-AtCLC1-HA, *clc1*-AtCLC2-HA. Las cepas de levaduras descritas en el gráfico, fueron crecidas a 28°C durante 13h. La DO_{620nm} fue medida a diferentes tiempos y expresada relativa a la DO inicial del cultivo. El experimento fue realizado tres veces con triplicado técnico. En la figura se grafica el promedio de la DO_{620nm} relativa, registrada en las tres réplicas experimentales, con su respectiva desviación estándar.

ha sido descrito en la literatura. Por otra parte, la cepa *clc1* que expresa la proteína ScClc1-HA, mostró una tasa de crecimiento similar al observado en WT-si-HA, permitiendo validar el ensayo de complementación. Interesantemente, no se observaron diferencias entre la tasa de crecimiento de la cepa *clc1*-AtCLC1-HA y *clc1*-si-HA. Adicionalmente, cabe notar que las levaduras *clc1* que expresan AtClc2-HA (*clc1*-AtCLC2-HA) crecieron de manera semejante a lo observado con la cepa *clc1*-AtCLC1-HA. Estos resultados revelan la incapacidad tanto de AtClc1-HA, así como de AtClc2-HA, de complementar la menor tasa de crecimiento de las levaduras *clc1*.

8. DISCUSIÓN

El tráfico vesicular mediado por clatrina ha mostrado una gran importancia en el correcto desarrollo y viabilidad de organismos vegetales (Surpin M. y Raikhel N., 2004). Por lo mismo, el estudio de los componentes moleculares que median el ensamblaje de esta envoltura, se ha visto fuertemente aumentado en la última década (Kitakura S. y cols., 2011; Van Damme D. y cols., 2011; Dhonukshe P. y cols., 2007). En este Seminario de Título se estudió la capacidad de AtClc1, una proteína de *A. thaliana*, de comportarse funcionalmente como una cadena liviana de clatrina. Dicho estudio se llevó a cabo realizando diversos ensayos de complementación en *Saccharomyces*. Los resultados aquí expuestos revelan que la expresión de AtClc1 en *S. cerevisiae clc1*, complementa algunos fenotipos alterados de esta cepa. Así, en conjunto con antecedentes bioinformáticos descritos en la literatura, nuestras observaciones revelan que AtClc1 se comporta funcionalmente como una cadena liviana de clatrina en *Saccharomyces*.

8.1 AtClc1 presenta un menor movimiento electroforético en un SDS-PAGE.

Uno de los primeros resultados interesantes obtenidos en este Seminario de Título, fue la menor movilidad electroforética registrada tanto por AtClc1-EGFP así como AtClc1-HA. Para la primera de ellas el error relativo porcentual (E_r) del tamaño molecular experimental, fue de un 27% respecto al valor teórico. En tanto, AtClc1-HA mostró un 39% de E_r en relación a lo predicho informáticamente. Similar a lo registrado por AtClc1, las proteínas AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP también mostraron una menor movilidad electroforética, arrojando un E_r de 17% y 18%,

respectivamente. Congruentemente, el tamaño experimental de AtClc2-HA mostró un E_r de 34%, mientras que ScClc1-HA registró un E_r de 21%.

Interesantemente, una característica que comparten las proteínas Clc, es su menor migración electroforética en un SDS-PAGE. En un estudio realizado por Silveira L. y cols. (1990), se obtuvo un tamaño molecular experimental para ScClc1 de 38KDa, con un E_r de un 43%, respecto al valor teórico (26,5KDa). Adicionalmente, el trabajo de Brodsky F. y Parham P. (1983) en conjunto con lo publicado por Jackson A. y cols. (1988), reveló que los tamaños moleculares de dos isoformas de Clc de bovino (LCa y LCb), obtenidos empíricamente en un SDS-PAGE, fueron un 30% mayor a los teóricamente esperados. Estudios previos han mostrado que, cuando los primeros noventa residuos aminoacídicos son removidos de una Clc de rata, el tamaño de la proteína obtenido experimentalmente, es consistente con el predicho teóricamente (Scarmato P. y Kirchhausen T, 1990). Se ha postulado que la abundancia de residuos de prolina en esta región, sería importante en la determinación de la movilidad electroforética de las proteínas Clc, en condiciones desnaturalantes. Adicionalmente, ha sido descrito que proteínas ricas en prolina presentan menor movilidad electroforética en presencia de SDS (Pham D. y Sivasubramanian N., 1992; Robinson R. y cols., 1989). Esto estaría dado, principalmente, debido a que prolina es un aminoácido cíclico, por lo que sus ángulos de torsión (ϕ/ψ) son restringidos, confiriéndole mayor rigidez al enlace peptídico (George R. y Heringa J., 2003). Congruentemente, esta rigidez dificultaría la internalización de SDS entre las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos. ScClc1, presenta un 5,5% de prolina en la región amino terminal. En tanto, AtClc1 y AtClc2 presentan en sus primeros noventa residuos, una

abundancia de prolina de un 8,8% y 6,7%, respectivamente. Estos porcentajes podrían dar explicación a las diferencias basales que existen entre los tamaños moleculares experimentales y teóricos obtenidos. Sin embargo, la mayor diferencia de tamaño observada en las proteínas de *A. thaliana*, dan indicios de la existencia de algún factor que se escapa a esta región amino terminal. Al realizar un análisis de secuencia completa, AtClc1 muestra que del total de sus aminoácidos, un 9,3% de ellos corresponden a prolina, versus el 7,6% en AtClc2 y el 2,6% en ScClc1. De este modo, se puede observar que la diferencia en el contenido de prolina entre las Clc de Arabidopsis y ScClc1 se incrementa al realizar un análisis de la secuencia aminoacídica completa. Así, AtClc1 y AtClc2, al presentar mayor porcentaje de prolina, dificultarían la entrada de SDS en la estructura de estas proteínas, de modo que su razón carga/masa sería menor. Por consiguiente, éstas migrarían más lentamente hacia el polo positivo de la electroforesis, arrojando tamaños moleculares mayores a los esperados en un SDS-PAGE.

8.2 AtCLC1-EGFP se localiza en el citoplasma de células de Saccharomyces silvestre y *clc1*.

La localización subcelular de AtClc1-EGFP en células de *S. cerevisiae* silvestre, mostró una distribución en el citoplasma de la célula, excluyendo notoriamente las regiones correspondientes a vacuolas. De forma semejante, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP mostraron una distribución homogénea en el citoplasma, en células de Saccharomyces silvestres. Si bien se ha descrito en la literatura que la proteína ScClc1 presenta una localización citoplasmática, ésta también revela una distribución punteada en regiones cercanas a la membrana plasmática y en trans-Golgi (Newpher

T. y col., 2005). Congruentemente, el mismo grupo de investigación anterior, describió que en carencia de ScChc, el patrón punteado de ScClc1 se pierde, distribuyéndose homogéneamente en el citoplasma de la célula. Dado que en levaduras silvestres existe expresión de ScClc1 endógena (ScClc1_{End}), la imposibilidad de observar una distribución punteada de AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP, podría deberse a una baja asociación de estas proteínas de fusión, con los componentes moleculares que median la formación de CCVs. Esto estaría dado por una posible competencia entre las proteínas fusionadas a EGFP y ScClc1_{End}, de modo que esta última, al presentar mayor afinidad por la maquinaria endógena, podría excluir de la estructura a las proteínas exógenas. Sin embargo, al expresar AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP, en células *clc1*, se observó que éstas se distribuyeron de forma semejante a lo descrito en levaduras silvestres, lo cual en parte, descarta la hipótesis anterior. Una segunda posible explicación a estas observaciones, es el hecho de que la fusión de AtClc1, AtClc2 y ScClc1 a EGFP, en el carboxilo terminal de la proteína, dificulte la unión de estas proteínas a ScChc, con la consiguiente pérdida de la asociación a estructuras membranosas. Esta hipótesis es poco probable, ya que publicaciones anteriores han demostrado que la fusión de EGFP en el extremo carboxilo terminal de una Clc, no inhabilitan su asociación con Chc (Gaidarov I. y col., 1999; Ehrlich M. y col., 2004; Konopka C. y col., 2008; Van Damme D. y col., 2011). Otro factor importante que podría estar gatillando este efecto, es el hecho de que estas proteínas fueron expresadas bajo el control de un promotor constitutivo. Los estudios de localización subcelular de ScClc1 en *S. cerevisiae clc1*, han sido realizados principalmente, expresando esta proteína fusionada a GFP, bajo el control del promotor endógeno del gen (Carroll S. y

col.,2012; Newpher T. y col. 2006). En ambos trabajos, los autores observaron pequeños puntos de fluorescencia emitida por GFP en zonas adyacentes a la membrana plasmática, así como en regiones perinucleares, los cuales eran posibles de contrastar con la fluorescencia basal del citoplasma celular. En ambas publicaciones, a pesar de que las células excitadas a una longitud de onda de 488nm, se expusieron a una potencia de 100% del láser (versus el 5% - 10% utilizados en este Seminario de Título), dichos autores no mostraron imágenes con regiones sobresaturadas en el espectro de emisión de EGFP. En contraste, si dichos porcentajes de potencia del láser de 488nm, hubiesen sido empleados para la adquisición de las imágenes de las Figuras 16 y 17, la señal de emisión de EGFP habría saturado el citoplasma. De esta forma, probablemente, en este trabajo no se pudo observar un patrón punteado en la localización de AtClc1-EGFP, AtClc2-EGFP y ScClc1-EGFP, debido a los altos niveles de expresión de estas proteínas. Considerando que la cantidad de proteína libre es mayor a aquella que se encuentra asociada a regiones de membrana con envoltura de clatrina, la señal de emisión de EGFP registrada en el citoplasma, puede haber dificultado la generación de un contraste suficiente, que permitiese la visualización de EGFP en pequeñas estructuras punteadas, como aquellas descritas en la literatura.

8.3 AtClc1-HA complementa parcialmente la menor tasa de endocitosis observada en *S. cerevisiae clc1*.

En este Seminario de Título se estudió la capacidad de AtClc1-HA de complementar la menor tasa de endocitosis en levaduras *clc1*. Los resultados obtenidos muestran la

importancia de ScClc1 en la endocitosis y apoyan lo descrito por Huang KM. y cols. (1997), quien observó una disminución de la tasa de endocitosis en *S. cerevisiae clc1*.

La expresión constitutiva de AtClc1-HA y AtClc2-HA revirtió parcialmente el fenotipo endocítico de la cepa *clc1*. Dado que la carencia de ScClc1 conlleva una deficiencia en la formación CCVs en *S. cerevisiae* (Huang K. y cols., 1997), se podría sugerir que la expresión de AtClc1-HA, así como AtClc2-HA, permite suplir la carencia de la proteína endógena, favoreciendo el ensamblaje de las CCV. Dicho ensamblaje podría estar dado por la interacción de AtClc1-HA y AtClc2-HA con ScChc1, permitiendo la constitución del triskelion en la célula. Sin embargo, no hay que obviar que ha sido propuesta una actividad de ScClc1 independiente de ScChc1 (Huang K. y cols, 1997). Dicha actividad estaría dada por la unión de ScClc1 con la proteína Sla2, la cual también se une a actina durante la formación de una CCV, mediando la interacción del citoesqueleto con la vesícula (Newpher T. y cols., 2006; Baggett J.J. y cols., 2003). Considerando esto, cabe la posibilidad de que AtClc1-HA y AtClc2-HA también interactúen con Sla2, promoviendo la endocitosis en células *clc1*.

Es importante notar que la expresión de AtClc1-HA y AtClc2-HA en la cepa *clc1*, provocó una reversión del fenotipo endocítico que no logró igualar el comportamiento de la cepa silvestre (WT-si-HA), ni de *clc1*-ScClc1-HA. Esta reversión parcial podría deberse a diferencias existentes entre la secuencia aminoacídica de las Clc de Arabidopsis y ScClc1 de Saccharomyces. De este modo, la interacción entre las proteínas de Arabidopsis y la maquinaria endógena de Saccharomyces, sería menos óptima al compararse con ScClc1. Congruentemente,

podría existir una menor eficiencia en la generación de CCV en las levaduras *clc1-AtClc1-HA* y *clc1-AtClc2-HA*, respecto a la cepa *clc1-ScClc1-HA*, traduciéndose en una reversión parcial del fenotipo endocítico de *clc1*. Es importante notar que la expresión constitutiva de las proteínas *AtClc1-HA* y *AtClc2-HA*, así como la fusión al péptido HA, podrían contribuir a la reversión parcial de la menor endocitosis en células *clc1* (Lo Presti L. y cols., 2009). Sin embargo, la expresión constitutiva de *ScClc1-HA*, permitió la endocitosis de FM4-64 al minuto ocho, de una forma similar a lo ocurrido en levaduras silvestres (Figura 18). Este resultado disminuye las probabilidades de que la fusión al péptido HA y la expresión constitutiva del promotor GPD, interfieran con la función de las proteínas *AtClc1-HA* y *AtClc2-HA*.

8.4 La expresión de *AtClc1-HA* complementa el fenotipo multivacuolar de *S. cerevisiae clc1*.

La carencia de *ScClc1* en *Saccharomyces clc1*, origina que la morfología vacuolar de las células sea principalmente “B” y “C”, versus el comportamiento de las levaduras silvestres, donde el fenotipo es mayoritariamente “A” (Seeley E. y cols., 2002). La expresión de *AtClc1-HA* en células *clc1*, produjo un aumento de la población con fenotipo “A” y “B” en la cepa *clc1-si-HA*, lo que significa que es capaz de suplir la función del gen endógeno, permitiendo la reversión del fenotipo multivacuolar. Adicionalmente, el hecho de que *clc1-AtCLC1-HA*, *clc1-AtCLC2-HA* y *clc1-ScCLC1-HA*, mostraran el mismo comportamiento en cuanto a la distribución de cada fenotipo dentro de su población, pone de manifiesto que la expresión de *AtClc1-HA* en la cepa *clc1*, permite que ésta se comporte como si expresara *ScClc1-HA* o

AtClc2-HA, dos cadenas livianas de clatrina que ya han sido funcionalmente caracterizadas.

ScClc1 participa en el tráfico desde TGN hacia endosomas tardíos, los que posteriormente pueden ser destinados a compartimentos vacuolares (Hinnens I. y Tooze SA., 2003). Por medio de esta ruta, ocurre un tráfico de proteínas que permiten la fusión de membranas entre distintos organelos, incluyendo las vacuolas. Se ha postulado que la carencia de ScClc1, disminuiría el transporte desde TGN hacia endosomas tardíos, evitando el tráfico de proteínas de fusión vacuolar (Seeley E. y cols., 2002). Al disminuir el transporte de estas proteínas, la fusión vacuolar se vería dificultada, observándose múltiples vacuolas en las levaduras *clc1*. Considerando que la cepa *clc1*-AtCLC1-HA se comporta como las levaduras *clc1*-ScCLC1-HA, se podría plantear que la proteína AtClc1-HA, tiene la capacidad de mediar la ruta de tráfico desde TGN hacia endosomas tardíos, permitiendo la destinación de proteínas de fusión vacuolar hacia estos compartimentos. Congruentemente, la presencia de dichas proteínas de fusión en las vacuolas de la célula, permitiría la unión de éstas, observándose un mayor porcentaje de células con morfología vacuolar tipo "A" (Seeley E. y cols., 2002).

Interesantemente, la carencia de ScChc1 en células de *Saccharomyces chc1*, provoca que un 25% de la población presente morfología vacuolar tipo "B" y un 25%, fenotipo "C" (Seeley E. y cols., 2002). Dichos porcentajes son menores a los mostrados por las levaduras *clc1* (50%B y 40%C; Seeley E. y cols., 2002), lo que abre la posibilidad de que la proteína ScClc1 participe en la constitución de la morfología vacuolar, de forma dependiente e independiente de ScChc1. Tal hipótesis

se podría explicar por una participación de ScClc1 tanto en la constitución de la vesícula a nivel de TGN (dependiente de ScChc1; Hinners I. y Tooze SA., 2003), así como en el *docking* de ésta en el compartimento blanco (independiente de ScChc1; Jaiswal J. y cols, 2009). Lo anterior se ve apoyado por publicaciones recientes, las que han descrito una posible participación de las proteínas de envoltura, en la efectiva fusión de la vesícula con su compartimento blanco (Trahey M. y Hay J, 2010; Jaiswal J. y cols, 2009). Considerando dichos antecedentes, existe la posibilidad de que AtClc1-HA presente la capacidad de participar en la fusión vesicular en *S. cerevisiae clc1*, de una forma independiente de ScChc1. Considerar una función de AtClc1-HA independiente de ScChc1 es importante, dado que se ha descrito que la carencia de ScClc1, disminuye significativamente los niveles de ScChc1 (Chu D. y cols, 1996). Sin embargo, la expresión de AtClc1-HA en levaduras *clc1* no necesariamente restituye los niveles de ScChc1, de modo que una posible acción de AtClc1 independiente de la cadena pesada de clatrina, podría permitir la complementación del fenotipo vacuolar en células *clc1*.

8.5 La expresión de AtClc1-HA no complementa la menor tasa de crecimiento observada en *S. cerevisiae clc1*.

Las levaduras *clc1* presentan una menor tasa de crecimiento respecto a las células silvestres de *Saccharomyces* (Figura 23). Sin embargo, la expresión de AtClc1-HA no revirtió esta condición en las células *clc1*. Interesantemente, este comportamiento también fue observado al expresar AtClc2-HA en células *clc1* (Figura 23). Este tipo de resultados, donde proteínas ortólogas no revierten algunos fenotipos de la respectiva cepa mutante, han sido descritos en otros estudios de complementación

heteróloga realizados en *S. cerevisiae* (Samach A. y cols., 2011; Scheuring S. y cols., 2001). Sin embargo, al verse suplementados por el análisis de complementación de otros fenotipos y/o ensayos más acuciosos, han permitido articular conclusiones respecto a la función de dichas proteínas (Samach A. y cols., 2011; Merrill S. y Hanson P., 2010). En estos casos, las causas de que uno de los fenotipos analizados, no sea complementado por la proteína ortóloga, estaría dado principalmente, por sus diferencias estructurales respecto a las proteínas endógenas, así como por la existencia de algunas discrepancias fisiológicas, propias de un sistema de expresión heterólogo. Particularmente, como se mencionó en la sección anterior, AtClc1-HA podría presentar características, que la imposibilitan de suplir completamente la función de ScClc1 en *Saccharomyces*. Sin embargo, esta evidencia no descarta la posibilidad de que AtClc1-HA se comporte funcionalmente como una cadena liviana de clatrina. Si se considerara sólo este parámetro para articular tal conclusión, AtClc2-HA tampoco debiera considerarse como una Clc, debido a que su expresión no complementó la menor tasa de crecimiento de la cepa *clc1*. Sin embargo, diversos antecedentes, así como los resultados previamente discutidos en este Seminario de Título, muestran a AtClc2 como una cadena liviana de clatrina. Congruentemente, el hecho de que AtClc1-HA no complemente la menor tasa de crecimiento de la cepa *clc1*, no desecha la hipótesis de que AtClc1 es una segunda Clc de *A. thaliana*.

8.6 AtClc1 se comporta funcionalmente como una cadena liviana de clatrina, en *S. cerevisiae*.

Responder a la hipótesis planteada en este Seminario de Título, requiere de un análisis conjunto de los resultados obtenidos. En primera instancia, se observó que

AtClc1 presenta una menor movilidad electroforética en un SDS-PAGE, lo cual es congruente con lo descrito para otras cadenas livianas de clatrina (Silveira L. y cols. 1990; Jackson A. y cols. 1988; Brodsky F. y Parham P. 1983). Adicionalmente, AtClc1 se localizó en el citoplasma de células de *Saccharomyces*, al igual que ScClc1 y AtClc2. Finalmente, AtClc1 se comportó como AtClc2 en cuanto a los niveles de complementación de los fenotipos alterados de la cepa *clc1*, revirtiendo la tasa de endocitosis y la morfología multivacuolar. A partir de estas observaciones se puede concluir que AtClc1 se comportó como una cadena liviana de clatrina en cada uno de los parámetros analizados. Congruentemente, esta conclusión aprueba la hipótesis planteada en este Seminario de Título, proponiendo a AtClc1 como una segunda Clc de *Arabidopsis*.

Un trabajo recientemente publicado, ratifica la aprobación de la hipótesis planteada en este Seminario (Wang C. y cols., 2013). Dichos autores determinaron que AtClc1, al igual que AtClc2, se localiza en el citoplasma y se asocia a la membrana plasmática, red trans Golgi (TGN) y endosomas tempranos en la célula vegetal. Adicionalmente, la asociación de AtClc1 a la membrana plasmática fue regulada negativamente por la hormona auxina, disminuyendo los niveles de endocitosis de proteínas de membrana. Interesantemente, la regulación mediada por auxina, de la abundancia de AtClc1 en la membrana plasmática, TGN y endosomas, fue independiente de la cadena pesada de clatrina (AtChc2). Esto abre la posibilidad de que AtClc1 tenga la capacidad de interactuar con otras proteínas distintas a la cadena pesada de clatrina, tal como ha sido descrito en otros organismos (Newpher T. y cols., 2006; Baggett J.J. y cols., 2003; Ybe J y cols., 1998). Congruentemente, plantas que

carecen de AtClc1 son inviables, debido a la incapacidad de germinación del polen (Wang C. y cols., 2013). Así, los estudios de Wang C. y cols. (2013) realizados en *A. thaliana* y los ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae clc1*, llevados a cabo en este Seminario de Título, son concluyentes para clasificar funcionalmente a AtClc1 como una segunda cadena liviana de clatrina de Arabidopsis.

9. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

La proteína AtClc1 comparte distintas características con las cadenas livianas de clatrina ScClc1 y AtClc2. En primer lugar, tanto AtClc1-HA, así como AtClc1-EGFP, mostraron menor movilidad electroforética en un SDS-PAGE, comportamiento común en cadenas livianas de clatrina. Adicionalmente, AtClc1-EGFP se localizó en el citoplasma celular de *Saccharomyces*, al igual que lo observado por ScClc1-EGFP y AtClc2-EGFP. Paralelamente, los estudios de complementación heteróloga realizados en este Seminario, permiten concluir que AtClc1-HA tiene la capacidad de complementar tanto el menor nivel de endocitosis así como el fenotipo multivacuolar de la cepa *clc1*. Concluyentemente, los resultados de este Seminario de Título permiten aprobar la Hipótesis planteada en la realización de este trabajo y entregan evidencias funcionales de la existencia de una segunda cadena liviana de clatrina en *A. thaliana*.

Proyecciones respecto al estudio de la especialización funcional de AtClc1, nacen a partir de los resultados de este Seminario y los descubrimientos aportados por Wang C. y cols. durante este año (sección 8.6). El hecho de que AtClc1 sea una proteína indispensable para la viabilidad de *Arabidopsis*, hace suponer una función específica de ésta, incapaz de ser suplida por sus proteínas parálogas AtClc2 y AtClc3. El fundamento de dicha especificidad, podría deberse a la presencia de dominios proteicos en AtClc1, ausentes en AtClc2 y AtClc3, los que le podrían conferir a AtClc1 la capacidad de participar en procesos biológicos exclusivos. Debido a que la importancia de AtClc1 en la viabilidad de *Arabidopsis*, estaría dada por su participación en la germinación del polen (Wang C. y cols., 2013; Schmid M y cols.

2005), estudios de inmuno-precipitación y colocalización con otras proteínas importantes en este proceso, podrían dar luces de la función celular de AtClc1, importantes para el desarrollo y viabilidad vegetal.

Considerando la importancia que el tráfico mediado por CCV tiene en la fisiología vegetal y el carácter regulatorio de la cadena liviana de clatrina en el correcto ensamblaje de esta envoltura, posibles proyecciones a nivel biotecnológico podrían ser propuestas. La modulación de este sistema, por medio de la expresión de determinadas proteínas de la envoltura de clatrina, podría favorecer ciertas rutas de tráfico intracelular, en pos de obtener un fenotipo vegetal de interés comercial. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para aterrizar nuevas perspectivas biotecnológicas, basadas en la regulación del transporte mediado por CCV.

10. REFERENCIAS

- Adam T, Bouhidel K, Der C, Robert F, Najid A, Simon-Plas F, Leborgne-Castel N. 2012. Constitutive expression of clathrin hub hinders elicitor-induced clathrin-mediated endocytosis and defense gene expression in plant cells. *FEBS Letters*, 586 (19):3293-98
- Baggett J.J, D'Aquino K.E, Wendland B. 2003. The Sla2p Talin Domain Plays a Role in Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 165:4 1661-1674
- Bar M, Benjamin S, Horowitz M, Avni A. 2008. AtEHDs in endocytosis. *Plant Signaling & Behavior* 3(11): 1008-1010
- Barth M, Holstein S. 2003. Identification and functional characterization of Arabidopsis AP180, a binding partner of plant α C-adaptin. *Journal of Cell Science* 117: 2051-2062
- Bolle C, Schneider A, Leister D. 2011. Perspectives on Systematic Analyses of Gene Function in *Arabidopsis thaliana*: New Tools, Topics and Trends. *Current Genomics* 12: 1-14
- Bouché N, Bouchez D. 2001. Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology* 4:111-117
- Brodsky F, Parham P. 1983. Polymorphism in clathrin light chains from different tissues. *J. molec. Biol.* 167:197-204
- Chen X, Irani N, Friml J. 2011. Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 674-682
- Chu D, Pishvae B, Payne G. 1996. The Light Chain Subunit Is Required for Clathrin Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Of Biological Chemistry* 271(51): 33123-33130
- Chu D, Pishvae B, Payne G. 1999. A Modulatory Role for Clathrin Light Chain Phosphorylation in Golgi Membrane Protein Localization during Vegetative Growth and during the Mating Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 10: 713-726
- Collette J, Chi R, Boettner D, Fernandez-Golbano I, Plemel R, Merz A, Geli M, Traub L, Lemmon S. 2009. Clathrin Functions in the Absence of the Terminal Domain Binding Site for Adaptor-associated Clathrin-Box Motifs. *Molecular Biology of the Cell* 20:3401-3413
- Collins A, Warrington A, Taylor KA y Svitkina T. 2011. Structural Organization of the Actin Cytoskeleton at Sites of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Curr. Biol.* 21(14): 1167-1175
- Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. 2001. *Nature* 411(6839): 826-833
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson D, Mravec J, Stierhof JD, Friml J. 2007. Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in Arabidopsis. *Current Biology* 17: 520-527
- Edeling M, Smith C, Owen D. 2006. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 7:32-44

- Eisenberg E, Greene LE. 2007. Multiple Roles of Auxilin and Hsc70 in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Traffic* 8: 640–646
- Feraru E, Paciorek T, Feraru M, Zwiewka M, De Grood R, De Rycke R, Kleine-Vehn J, Friml J. 2010. The AP-3 b Adaptin Mediates the Biogenesis and Function of Lytic Vacuoles in Arabidopsis. *The Plant Cell* 22: 2812–2824
- Fotin A, Cheng Y, Sliz P, Grigorieff N, Harrison S, Kirchhausen T, Walz T. 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432:573-579
- George R, Heringa J. 2003. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Engineering* 15(11): 871–879
- Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol* 4:8
- Hinners I, Tooze SA. 2003. Changing directions: clathrin-mediated transport between the Golgi and endosomes. *J Cell Sci.* 116, 763-771.
- Holstein S. 2002. Clathrin and Plant Endocytosis. *Traffic* 3: 614–620.
- Huang K, Gullberg L, Nelson K, Stefan C, Blumer K, Lemmon S. 1997. Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *Journal of Cell Science* 110: 899-910
- Hughson F. 2010. Copy coats: COPI mimics clathrin and COPII. *Cell* 142: 19-21.
- Huh W, Falvo J, Gerke L, Carroll A, Howson R, Weissman J, O'Shea E. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.
- Ito E, Fujimoto M, Ebine K, Uemura T, Ueda T, Nakano A. 2012. Dynamic behavior of clathrin in *Arabidopsis thaliana* unveiled by live imaging. *The Plant Journal* 69: 204–216.
- Jackson A, Parham P. 1988. Structure of Human Clathrin Light Chains: Conservation Of Light Chain Polymorphism In Three Mammalian Species. *The Journal Of Biological Chemistry* 263(32): 16688-16635
- Jaiswal J, Rivera V, Simon S. 2009. Exocytosis of Post-Golgi Vesicles Is Regulated by Components of the Endocytic Machinery. *Cell*, 137(7): 1308-1319
- Jiang L, Phillips T, Hamm C, Drozdowicz Y, Rea P, Maeshima M, Rogers S, Rogers J. 2001. The protein storage vacuole: a unique compound organelle *The Journal of Cell Biology* 155(6): 991-1002
- Jürgens G. 2004. Membrane trafficking in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:481–504
- Kirchhausen T, Toyod T. 1993. Immunoelectron Microscopic Evidence for the Extended Conformation of Light Chains in Clathrin Trimers. *The Journal of Biological Chemistry* 268(14): 10268-10273.

- Kirchhausen T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nature reviews, Molecular Cell Biology* 1: 187-198
- Kitakura S, Vanneste S, Robert S, Löffke C, Teichmann T, Tanaka H, Friml J. 2011. Clathrin Mediates Endocytosis and Polar Distribution of PIN Auxin Transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23: 1920–1931
- Konopka C, Backues S, Bednarek S. 2008. Dynamics of Arabidopsis Dynamin-Related Protein 1C and a Clathrin Light Chain at the Plasma Membrane. *The Plant Cell* 20: 1363–1380
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Liu S, Wong M, Craik C, Brodsky F. 1995. Regulation of Clathrin Assembly and Trimerization Defined Using Recombinant Triskelion Hubs. *Cell* 83:257-267
- Lo Presti L, Cerutti L, Monod M, Hauser PM. 2009. Choice of an adequate promoter for efficient complementation in *Saccharomyces cerevisiae*: a case study. *Res Microbiol.* 160(6):380-8
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108(1):1-6
- Maldonado-Mendoza I, Nessler C. 1997. Molecular characterization of the AP19 gene family in *Arabidopsis thaliana*: components of the Golgi AP-1 clathrin assembly protein complex. *Plant Molecular Biology* 35: 865–872
- Marty F. 1999. Plant Vacuoles. *The Plant Cell* 11: 587–599.
- McMahon H, Boucrot E. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 12:517-533
- Merrill S, Hanson P. 2010. Activation of Human VPS4A by ESCRT-III Proteins Reveals Ability of Substrates to Relieve Enzyme Autoinhibition. *The Journal Of Biological Chemistry* 285(46): 35428 –35438
- Nagawa S, Xu T, Lin D, Dhonukshe P, Zhang X, Friml J, Scheres B, Fu Y, Yang Z. 2012. ROP GTPase-Dependent Actin Microfilaments Promote PIN1 Polarization by Localized Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLoS Biol* 10(4): e1001299.
- Nebenführ A. 2002. Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs. *Current Opinion in Plant Biology* 5:507–512
- Newpher T, Idrissi F, Geli M, Lemmon S. 2006. Novel Function of Clathrin Light Chain in Promoting Endocytic Vesicle Formation. *Molecular Biology of the Cell* 17: 4343–4352
- Newpher T, Smith R, Lemmon V, Lemmon S. 2005. In Vivo Dynamics of Clathrin and Its Adaptor-Dependent Recruitment to the Actin-Based Endocytic Machinery in Yeast. *Developmental Cell* 9: 87–98.

- Paul M, Frigerio L. 2007. Coated vesicles in plant cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 471–478
- Perera RM, Zoncu R, Lucast L, De Camilli P, Toomre D. 2006. Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *PNAS* 103(51): 19332-19337
- Pettersson N, Hagström J, Bill R, Hohmann S. 2006. Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 50:247–255
- Pham D, Sivasubramanian N. 1992. Sequence and in vitro translational analysis of a 1629-nucleotide ORF in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus strain E2. *Gene* 122(2):345–348
- Robinson R, Kauffman D, Wayne M, Blum M, Bennick A, KELLER P. 1989. Primary structure and possible origin of the non-glycosylated basic proline-rich protein of human submandibular/sublingual saliva. *Biochem J.* 263(2): 497-503
- Samuels A, Giddings T, Staehelin L. 1995. Cytokinesis in Tobacco BY-2 and Root Tip Cells: A New Model of Cell Plate Formation in Higher Plants. *The Journal of Cell Biology*, 130(6): 1345-1357
- Scheele U, Holstein S. 2002. Functional evidence for the identification of an *Arabidopsis* clathrin light chain polypeptide. *FEBS Letters* 514: 355-360
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37:501–6
- Seeley E, Kato M, Margolis N, Wickner W, Eitzen G. 2002. Genomic Analysis of Homotypic Vacuole Fusion. *Molecular Biology of the Cell* 13:782–794
- Sundborger A, Soderblom C, Vorontsova O, Evergren E, Hinshaw J.E., Shupliakov O. 2011. An endophilin–dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *Journal of Cell Science* 124: 133-143
- Surpin M, Raikhel N. 2004. Traffic Jams Affect Plant Development And Signal Transduction. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 5:100-109
- Trahey M, Hay JC. 2010. Transport vesicle uncoating: it's later than you think. *F1000 Biology Reports* 2:47
- Ungewickell E, Ungewickell H. 1991. Bovine Brain Clathrin Light Chains Impede Heavy Chain Assembly in Vitro. *The Journal Of Biological Chemistry* 266(19): 12710-12714
- Van Damme D, Gadeyne A, Vanstraelen M, Inzé D, Van Montagu M, De Jaeger G, Russinova E, Geelen D. 2011. Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *PNAS* 108(2): 615–620
- Van Pelt-Verkuil E, Van Belkum A, Hays J. (2008). Principles and Technical Aspects of Polymerase Chain Reaction Amplification. *Springer Science.* 5: 67-68.

- Van-Khue T, Rao R. 2004. Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} -transporting ATPases. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:580-589
- Vida T, Erm S. 1995. A New Vital Stain for Visualizing Vacuolar Membrane Dynamics and Endocytosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology* 128:5 1995779-792
- Wang C, Yan X, Chen Q, Jiang N, Fu W, Ma B, Liu J, Li C, BeADNrek SY, Pana J. 2013. Clathrin Light Chains Regulate Clathrin-Mediated Trafficking, Auxin Signaling, and Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25: 499-516
- Wilbur J, Hwang P, Ybe J, Lane M, Sellers B, Jacobson M, Fletterick R, Brodsky F. 2010. Conformation Switching of Clathrin Light Chain Regulates Clathrin Lattice Assembly. *Developmental Cell* 18: 854-861
- Ybe J, Greene B, Liu SH, Pley U, Parham P, Brodsky M. 1998. Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *The EMBO Journal* 17(5): 1297-1303
- Yesilirmak F, Sayers Z. 2009. Heterologous Expression of Plant Genes. *International Journal of Plant Genomics*, Article ID 296482.
- Zhou C, Yang Y, Jong AY. 1990 Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8(2):172-173